



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Auswirkungen der Gerüstproteine Gephyrin und Collybistin auf die Funktionalität von inhibitorischen Rezeptoren

Dem Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegte Dissertation von

Dipl.-Biol. Jan Baltzer

aus Darmstadt

1. Referent: Prof. Dr. Bodo Laube
2. Referent: Prof. Dr. Adam Bertl

Darmstadt 2018

Baltzer, Jan: Auswirkungen der Gerüstproteine Gephyrin und Collybistin auf die Funktionalität von inhibitorischen Rezeptoren

Darmstadt:, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf Tprints: 2018

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2018

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

Zusammenfassung:

Der Glyzin - Rezeptor (GlyR) und der GABA_A - Rezeptor (GABA_AR) sind ligandengesteuerte inhibitorische Chloridkanäle, welche durch die Aminosäuren Glyzin und GABA aktiviert werden. Als Mitglieder der nikotinischen Azetylcholinrezeptor-Familie (nAChR) besitzen der GlyR und der GABA_AR einen pentameren Aufbau. Beim GlyR sind vier α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 4$ UE) und eine β -UE bekannt die jeweils aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne, 4 Transmembrandomänen und einer großen intrazellulären Schleife bestehen. Die GABA_ARs können sich aus einer Vielzahl von 21 UEs $\alpha(1-6)$, $\beta(1-3)$, $\gamma(1-3)$, δ , ϵ , π , θ , $\rho(1-3)$ zusammensetzen. Eine hohe lokale Konzentration von GlyRs und GABA_ARs an inhibitorischen Synapsen ist entscheidend für eine effiziente glyzin-/GABAerge Signal-Transmission im Nervensystem und wird durch die Interaktion mit dem Verankerungsprotein Gephyrin gewährleistet. Aufgrund der Dimerisierungs – und Trimerisierungseigenschaften der Gephyrin - Domänen wird angenommen, dass sich unterhalb der postsynaptischen Membran eine hexagonale Matrix ausbildet. In der hexagonalen Matrix entstehen hochaffine Bindestellen für die β -UE des GlyR und die β -UEs und α -UEs des GABA_AR. Die Gephyrin – Bindemotive (gbm) sind in der intrazellulären Schleife (TM3-TM4) der Untereinheiten zu finden. Bei der Akkumulierung von Gephyrin unterhalb der postsynaptischen Membran nimmt der Gehirn-spezifische GDP/GTP Austausch Faktor Collybistin (Cb) eine tragende Rolle ein. So wird angenommen das Cb über die Interaktion der Pleckstrin-homologen Domäne (PH) mit membranständigen PI3P Gephyrin-CbII Komplexe zur postsynaptischen Membran rekrutiert. Ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Rekrutierung des Geph-Cb - Komplexes zur Membran nimmt die src homologe 3 (SH3) – Domäne ein. Die SH3 – Domäne agiert als auto – inhibitorische Domäne und belässt Cb in einer inaktiven Konformation. Die Neuroligine (NL) 2 und 4 können mit der SH3 – Domäne des Cb wechselwirken und Cb in eine aktive Konformation überführen. GlyRs welche aufgrund Ihrer fehlenden Wechselwirkung mit dem postsynaptischen Gephyrin-Collybistin-Komplex nicht interagieren können sind extrasynaptisch in der Zellmembran lokalisiert. Die Untersuchungen mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (engl. TEVC) nach heterologer Expression in den Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs

Xenopus laevis ergaben, dass die intrazellulär lokalisierten Proteine Gephyrin und Collybistin II SH3-, die apparente Glyzin – Affinität des heteropentameren GlyR $\alpha 1\beta$ und des homopentameren GlyR $\alpha 1$ -gbm um das 1,5 bis 10-fache verringern, jedoch keine apparente – Glyzin - Affinitätsveränderung beim homooligomeren GlyR $\alpha 1$ -wt bewirken. Nach dem Ausschalten der membranwechselwirkenden PH – Domäne von Collybistin II SH3- durch Punktmutationen in der PH – Domäne (RR363-364-NN) ist keine Verringerung der apparenten Glyzin - Affinität mehr zu beobachten. Neuroligin 2 verringert die apparente Glyzin-Affinität des GlyR $\alpha 1$ -gbm nach Ko – Expression mit Gephyrin und der inaktiven Collybistin II SH3+ Variante. Gephyrin und Collybistin II SH3- verringern die apparente GABA – Affinität bei GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ und GABA_AR $\alpha 2\beta 3$. Bei GABA_AR $\alpha 2\beta 3$ ist dieser Effekt auch ohne die Ko – Expression mit Gephyrin zu beobachten. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Gephyrin und Collybistin II SH3- die apparente Glyzin – und Glutamat – Affinität des exzitatorisch fungierenden N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors (NMDA), nach der Einklonierung des Gephyrin – Bindemotivs in die NR1 – Untereinheit, verringern. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Gephyrin und Collybistin II SH3- mit GlyR $\alpha 1$ -gbm zu einer drastischen Reduktion des partiellen Agonisten Taurin vermittelten maximal induzierbaren Stroms führt. Die Oligomerisierungsdomänen von Gephyrin beeinflussen die Verringerung der apparenten Glyzin - Affinität des GlyR $\alpha 1$ -gbm.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Auswirkungen der Gerüstproteine Gephyrin und Collybistin durch eine funktionelle Analyse von ionotropen Rezeptoren mittels TEVC charakterisiert werden können. Somit konnte das Ziel der Etablierung einer zur Validierung geeigneten Methode für die Untersuchung von Rezeptoren mit intrazellulären Proteinen erreicht werden. Diese Untersuchungsmethode könnte in Zukunft dabei helfen die Auswirkungen von krankheitsassoziierten Mutationen in Rezeptor – interagierenden Proteinen auf die Rezeptor Funktionalität zu beschreiben.

Abstract:

The Glycine receptor (GlyR) and GABA_A receptor (GABA_AR) are inhibitory ligand-gated ion channels which can be activated by glycine and GABA. GlyRs and GABA_ARs are members of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) family and have a pentameric composition. Four α -subunits and one β -subunit are known for GlyRs and each subunit consists of an extracellular loop, 4 transmembrane domains and one large intracellular loop. Twenty-one subunits $\alpha(1-6)$, $\beta(1-3)$, $\gamma(1-3)$, δ , ϵ , π , θ , $\rho(1-3)$ are known for GABA_ARs which leads to a huge amount of possible receptor compositions. A high local concentration of GlyRs and GABA_ARs at inhibitory synapses is essential for an efficient glycine-/GABA-mediated signal transmission in the central nervous system and this can be ensured through interaction with the scaffolding protein Gephyrin. Gephyrin domains can form dimers and trimers and it is hypothesized that these abilities result in a hexagonal matrix beneath the postsynaptic membrane. High-affinity binding positions occur for β -subunit of GlyRs and β -subunits and α -subunits of GABA_ARs in the hexagonal matrix. Gephyrin binding motifs (gbm) are located in the intracellular loop (TM3-TM4) of each subunit. The guanine-nucleotide exchange factor Collybistin (Cb) is essential for Gephyrin recruitment beneath the postsynaptic membrane. It is hypothesized that the pleckstrin homologue domain (PH) of Cb interacts with PI3P and recruits Gephyrin-CbII complexes to the postsynaptic membrane. The src homologue domain (SH3) of Cb acts as an auto-inhibitory domain and leaves Cb in an inactive conformation. Neuroligins (NL) 2 and 4 can interact with the SH3 domain of Cb and convert Cb to an active conformation. GlyRs which have not the ability to bind to the Gephyrin-Collybistin complexes are located in extrasynaptic membrane regions. The experiments conducted by two-electrode voltage clamp after heterologous expression in oocytes of the African clawed frog indicated that Gephyrin and Collybistin II SH3-decrease 1.5 up to 10-fold the glycine apparent affinity of heteropentameric GlyR $\alpha 1\beta$ and homopentameric GlyR $\alpha 1$ -gbm but no change in apparent glycine affinity on homopentameric GlyR $\alpha 1$ -wt was detected. The amino acid replacements (RR363-364NN) in the membrane-interacting PH-domain of Collybistin II SH3-shows no

decrease of apparent glycine affinity. Neuroligin 2 decrease apparent glycine affinity after co-expression with Gephyrin and inactive Collybistin II SH3+. Gephyrin and Collybistin II SH3- decrease apparent GABA – affinity of GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ and GABA_AR $\alpha 2\beta 3$. This effect is also visible without Gephyrin co-expression at GABA_AR $\alpha 2\beta 3$. The Experiments also shows that Gephyrin and Collybistin II SH3- decrease apparent glycine- and glutamate affinity at N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDA) after insertion of the Gephyrin binding motive in the NR1 – subunit. Furthermore it could be shown that the interaction of Gephyrin and Collybistin II SH3- with GlyR $\alpha 1$ -gbm leads to a drastic reduction of the partial agonist Taurin related maximal inducible current. The Oligomerization of Gephyrin – domains affect the decrease of apparent glycine affinity of GlyR $\alpha 1$ -gbm.

It was shown in this dissertation that effects of the scaffolding proteins Gephyrin and Collybistin on ionotrope receptors could be functionally analysed with TEVC. Therefore a method for validation of the interaction between intracellular proteins and receptors was established. This method could be very helpful in near future to understand and describe the impact of disease-associated mutations in receptor interacting proteins on receptor functionality.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Cys-Loop-Rezeptoren	1
1.2 Der Glyzin – Rezeptor (GlyR)	2
1.3 Der γ -Aminobuttersäure Rezeptor (GABA _A R).....	4
1.4 Die Rolle von Gephyrin und Collybistin bei der Anreicherung von GlyRs und GABA _A Rs in der postsynaptischen Membran	5
1.4.1 Gephyrin.....	5
1.4.2 Collybistin.....	7
1.4.3 Die Rolle von Neuroligin bei der Anreicherung von Gephyrin und Collybistin unterhalb der Plasmamembran.....	9
Ziel der Arbeit:	11
2 Material	12
2.1 DNA-Konstrukte.....	12
2.2 Enzyme.....	12
2.2.1 Restriktionsendonuklease	12
2.2.2 Sonstige verwendete Enzyme	13
2.3 Marker.....	13
2.3.1 DNA-Längenstandard	13
2.3.1 Proteinstandard	13
2.4 Kits.....	13
2.5 Puffer und Lösungen	13
2.6 Chemikalien.....	15
2.7 Material und Geräte	16
3 Methoden	18

3.1 Molekularbiologische Methoden.....	18
3.1.1 Hitzetransformation	18
3.1.2 Gewinnung von Plasmid-DNA durch Isolierung aus E.coli Kulturen mittels Qiagen-Kits	18
3.1.3 Midipräparation.....	18
3.1.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	19
3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	20
3.1.6 Linearisieren der DNA mittels Restriktionsenzym Not I.....	21
3.1.7 Die <i>in vitro</i> Transkription	22
3.2 Elektrophysiologische Methoden.....	23
3.2.1 <i>Xenopus laevis</i> als Oozytenexpressionssystem	23
3.2.2 Haltung der Frösche	25
3.2.3 Entnahme und Präparation der Oozyten	25
3.2.4 Herstellung von Injektionskappilaren.....	27
3.2.5 Injektion der cRNA.....	27
3.2.6 Elektrophysiologische Ableitungen an Oozyten.....	28
3.2.6.1 Versuchsaufbau	28
3.2.6.2 Theoretischer Hintergrund der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	29
3.2.6.3 Herstellung der Ableitelektroden.....	30
3.2.6.4 Chlorierung von Silberelektroden	30
3.2.6.5 Ablauf der Messungen.....	31
3.2.6.6 Aufnahme von Dosiswirkungskurven des GlyR Agonisten Glyzin bei GlyR α 1-wt und GlyR α 1-gbm.....	31
3.2.6.7 Auswertung der Dosiswirkungskurven des GlyR Agonisten Glyzin bei GlyR α 1-wt und GlyR α 1-gbm.....	32

3.2.6.8 Statistische Analyse der Rezeptorantworten	32
3.3 Biochemische Methoden.....	33
3.3.1 Metabolische Markierung	33
3.3.2 Aufreinigung von 6-fach Histidin-markierten Proteinen aus <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	33
3.3.3 Analyse des N-Glykosylierungsverhaltens von Proteinen.....	35
3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.4 Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	38
4. Ergebnisse.....	39
4.1 Gephyrin und Collybistin II SH3- verringern die apparente Glyzin-Affinität des heteropentameren GlyR $\alpha 1\beta$	39
4.2 Homopentamere GlyR $\alpha 1$ -gbm zeigen im Gegensatz zu GlyR $\alpha 1$ -wt nach Ko- Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- eine Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität	43
4.3 Untersuchung des Einflusses von Gephyrin und Collybistin II SH3- auf die Translokation des GlyR mittels CLSM	45
4.4 Das Anhängen von GFP an den C-Terminus des GlyR $\alpha 1$ -gbm beeinflusst nicht die durch Gephyrin und Collybistin II SH3- hervorgerufene apparente Glyzin – Affinitätsverringerng	46
4.5 Collybistin II SH3- bestimmt die Translokation von GlyR $\alpha 1$ -gbm und Gephyrin.....	47
4.6 Collybistin II SH3- bewirkt eine Zunahme der GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP Clustergröße nach Ko – Expression mit Gephyrin.....	50
4.7 Die Wechselwirkung des inhibitorischen GABA _A Rs mit Gephyrin und Collybistin II SH3- führt wie bei GlyR $\alpha 1$ -gbm zu einer Verringerung der apparenten Liganden – Affinität.....	51
4.8 Gephyrin und Collybistin II SH3- verringern die apparente GABA – Affinität bei GABA _A $\alpha 1\beta 3$	51

4.9 Collybistin II SH3- verringert die apparente GABA – Affinität bei GABA _A R $\alpha 2\beta 3$ auch ohne Gephyrin	52
4.10 Gephyrin und Collybistin II SH3- verringern nicht die apparente GABA – Affinität von GABA _A Rs nach Ko – Expression der γ - Untereinheit.....	54
4.11 Einfluss von Gephyrin und Collybistin II SH3- auf die apparente Liganden – Affinität von NMDARs.....	56
4.12 Gephyrin und Collybistin II SH3- verringern die apparente Glyzin – und Glutamat – Affinität des NMDAR	57
4.13 Die Interaktion von Gephyrin und Collybistin II SH3- mit GlyR $\alpha 1$ -gbm führt zu einer drastischen Reduktion des Taurin vermittelten maximal induzierbaren Stroms. 60	
4.15 Einfluss der SH-, DH- und PH-Domäne von Collybistin auf die apparente Glyzin - Affinitätsverringerng	62
4.16 Die SH3 – Domäne von Collybistin schwächt die Erhöhung des EC ₅₀ – Wertes von GlyR $\alpha 1$ -gbm ko-exprimiert mit Gephyrin ab	63
4.17 NL2 verringert die apparente Glyzin-Affinität des GlyR $\alpha 1$ -gbm nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3+	65
4.18 Die verankernde DH- und die katalytische PH – Domäne sind essenziell für die Verringerung der apparenten Glyzin - Affinität durch Collybistin II SH3-	66
4.19 Der Einfluss von Gephyrin und seinen Eigenschaften auf die apparente Glyzin - Affinität des GlyR $\alpha 1$ -gbm	68
4.20 Die Gephyrin – GlyR $\alpha 1$ -gbm Wechselwirkung ist erforderlich für die Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität	69
4.21 Die Di- und Trimerisierungseigenschaften von Gephyrin beeinflussen die Verringerung der apparenten Glyzin - Affinität des GlyR $\alpha 1$ -gbm	70
5. Diskussion:	74
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse:	74

5.2 Die Schlüsselrolle der Collybistin - Verankerung bei der Verringerung der apparenten Liganden – Affinität von postsynaptischen Rezeptoren.....	75
5.3 Collybistin II SH3- begünstigt möglicherweise die Inkorporation von Rezeptoren in PI3P – reiche Membranregionen.....	78
5.4 Einfluss der Interaktions – Möglichkeiten von GlyRs und Gephyrin auf die apparente Glyzin-Affinität	81
5.5 Gephyrin und Collybistin II SH3- bewirken bei GABA _A Rs nach Ko-Expression mit der γ2s – Untereinheit keine Verringerung der apparenten GABA – Affinität.....	83
5.6 Vergleich der Wechselwirkungsstärken von GABA _A R α -, β – Untereinheiten mit Gephyrin und von der GlyR β – Untereinheit mit Gephyrin und deren Einfluss auf die apparente Liganden - Affinität	84
5.7 Auswirkungen von Gephyrin und Collybistin II SH3- auf die Taurin vermittelte Stromantwort des GlyR	85
5.8 Mögliche physiologische Relevanz von niederaffinen synaptischen Rezeptoren und hochaffinen extrasynaptischen Rezeptoren am Beispiel des GlyRs.....	86
5.9 Ausblick.....	86
Literaturverzeichnis	88

1. Einleitung

1.1 Cys-Loop-Rezeptoren

Zu der Superfamilie der Cys-Loop-Rezeptoren gehören die Kationen leitenden nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR), die 5-hydroxytryptamine Rezeptoren (5-HT₃ Rezeptor) sowie die Chloridionen leitenden γ – Aminobuttersäure Rezeptoren (GABA_A/GABA_C) und der Glyzinrezeptor (GlyR). Alle diese Familienmitglieder besitzen einen pentameren Aufbau d.h 5 Untereinheiten umkleiden die Ionen leitende Kanalpore (Ortells und Lunt, 1995, Betz, 1990). Diese Untereinheiten können in den meisten Fällen sowohl Homopentamere als auch Heteropentamere Rezeptoren bilden. Heteropentamere bestehen gewöhnlich aus zwei alpha – Untereinheiten und drei beta-, gamma-, oder delta – Untereinheiten (Brejc et al., 2001). Alle Untereinheiten der Cys-Loop-Rezeptoren besitzen eine große extrazelluläre N-terminale Domäne, welche eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielt (Arias, 2000), vier Transmembrandomänen (M1-M4) wobei die Transmembrandomänen M3 und M4 über eine große intrazelluläre Schleife miteinander verknüpft sind (Abb.1.1B). Diese intrazelluläre Schleife ist das Ziel von einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen, welche einen direkten Effekt auf die Kanalfunktion ausüben können. Weiterhin mediert die TM3-TM4 – Region Interaktionen mit zytosolischen Proteinen, welche eine wichtige Rolle bei der Rezeptorlokalisierung und beim Membrantransport einnehmen (Conroy et al., 2003, Meyer et al., 1995).

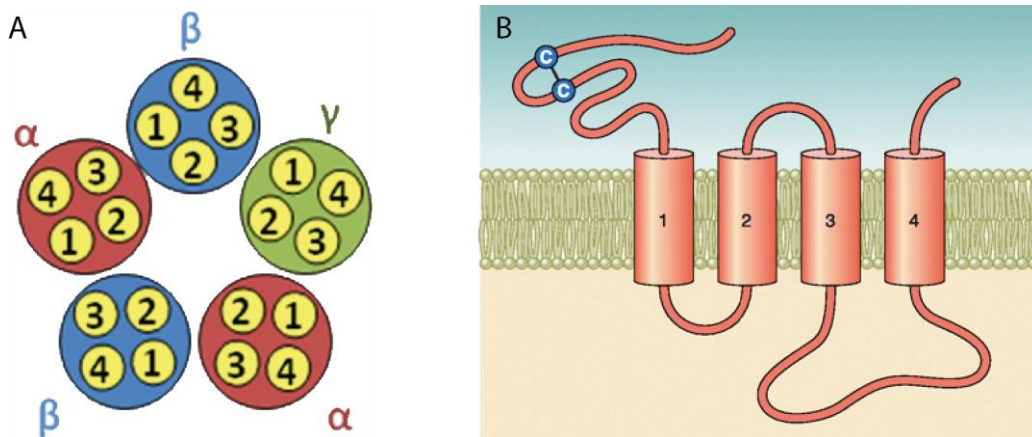


Abb.1.1: Aufbau und Struktur der cys-Loop-Rezeptoren. (A) Dargestellt ist der pentamere Aufbau eines Cys-Loop-Rezeptors anhand des zur Familie gehörenden GABA_AR mit der Stöchiometrie 2α(rot)/2β(blau)/γ(grün). Die Zahlen in jeder Untereinheit stellen die Transmembrandomäne und deren Lokalisation dar. Die Transmembrandomäne zwei umkleidet die Kanalpore. (B) Topologie einer Untereinheit der cys-Loop-Rezeptoren Familie. Jede Untereinheit besitzt eine große extrazelluläre N-terminale Domäne, in welcher der für die Familie namensgebende konservierte cys-Loop liegt. Vier Transmembrandomänen (M1-M4) durchspannen die Membran. Die M3 ist mit der M4 über eine große intrazelluläre Schleife verknüpft, die unter anderem mit Proteinen wie z.B Gephyrin wechselwirken kann und somit zur Verankerung des Rezeptors in der Membran beiträgt. Eine kurze extrazelluläre C-terminale Domäne schließt sich der M4 an (modifiziert nach Gurba 2010; Zeilhofer 2012).

Weiterhin besitzt jede Untereinheit eine kurze extrazelluläre C – terminale Aminosäuresequenz. Die Transmembrandomänen zwei (M2) jeder Untereinheit kleiden die Kanalpore aus und beherbergen den Selektivitätsfilter (Abb.1.1A). Die Namensgebung der Cys-Loop-Rezeptoren beruht auf eine durch Cystein-Reste gebildeten Schleife in der N-terminalen extrazellulären Domäne (Corringer et al., 2000).

1.2 Der Glyzin – Rezeptor (GlyR)

Der GlyR ist hauptsächlich ein inhibitorischer Kanal und gehört zur Familie der cys-Loop Liganden gesteuerter Ionen – Kanäle und bewirkt einen Chlorid – Ionen Einstrom in das nachgeschaltete Neuron (Lynch, 2004). Hauptsächlich wird der GlyR in der Retina, im Rückenmark und im Hirnstamm exprimiert und reguliert im Zusammenspiel mit exzitatorischen Rezeptoren koordinierte Bewegungsabläufen der Skelettmuskulatur, Reflexe und die Signalverarbeitung sensorischer Eingänge (Legendre, 2001).

Glyzin ist die am einfachsten aufgebaute Aminosäure und erfüllt im Säuger Zentralnervensystem (ZNS) diverse metabolische Funktionen. Ähnlich wie GABA fungiert Glyzin als Neurotransmitter an der inhibitorischen Synapse und aktiviert Strychnin-sensitive GlyRs (Betz und Laube 2006). Die Bindung von Glyzin an den GlyR bewirkt ein transientes Öffnen der selektiven Pore, was ein passives einströmen von Cl^- - Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten ermöglicht. Dies führt zu einer Hyperpolarisierung der Neuronenmembran bzw. zu einer Stabilisierung des Ruhemembranpotentials, wodurch die Ausbildung von Aktionspotentialen erschwert wird. In embryonalen Zellen können GlyRs, im Wesentlichen aus $\alpha 2$ – homopentameren aufgebaut, eine andere Funktion besitzen. Hierbei kommt es nach Bindung von Glyzin am GlyR zu einem ausströmen von Cl^- - Ionen wodurch die Neuronenmembran depolarisiert wird. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in frühen Stadien des Gehirns die Cl^- - Ionen Konzentration in der Zelle höher ist als im extrazellulären Raum. Der GlyR kann somit, je nach Entwicklungsstatus, sowohl eine inhibitorische als auch exzitatorische Funktion besitzen (Betz et al., 1999).

Der GlyR war der erste Rezeptor, welcher aus dem Säugerhirn isoliert werden konnte (Pfeiffer et al., 1982; Graham et al., 1985; Becker et al., 1986). Nach Affinitätsaufreinigung des GlyR konnten zwei glykosilierte Membranproteine mit 48kDa und 56kDa identifiziert werden, welche als α und β Untereinheiten klassifiziert wurden (Langosch et al., 1988). Bisher wurden fünf verschiedene GlyR – Untereinheiten, vier α – Untereinheiten ($\alpha 1$ – $\alpha 4$) und eine β – Untereinheit identifiziert (Matzenbach et al., 1994; Lynch et al., 2004). Die α – Untereinheiten besitzen eine hohe Homologie und sind bis zu 90% identisch in der Aminosäuresequenz, die β – Untereinheit ist hingegen nur zu 47% mit der $\alpha 1$ – Untereinheit sequenzidentisch (Grenningloh et al., 1990). GlyR β Untereinheiten sind alleine nicht in der Lage funktionelle Rezeptoren zu bilden (Malosio et al., 1991; Singer et al., 1998; Grenningloh et al., 1990; Fujita et al., 1991). Der erste Schritt bei der Bildung des heteropentameren Komplexes ist vermutlich die Ausbildung eines α/β Heterodimers (Griffon et al., 1999). Die GlyRs assemblieren mit einer Stöchiometrie von 2α - und 3β

Untereinheiten (Grudzinska et al., 2005). Nach heterologer Expression in HEK293 bzw. Oozyten können die α – Untereinheiten homopentamere funktionelle GlyRs bilden.

Glyzin ist nicht der einzige Ligand des GlyR. Weitere Aminosäuren besitzen ebenfalls einen aktivierenden Effekt auf den GlyR und werden aufgrund ihrer schwächeren Effizienz als partielle Agonisten bezeichnet. Die Aktivierungsstärke nimmt in folgender Reihenfolge ab: Glyzin > β -Alanin > Taurin > GABA. Außerdem hängt der Wirkungsgrad der partiellen Agonisten vom Expressionssystem ab. In GlyR exprimierenden Oozyten agieren β -Alanin und Taurin meistens als partielle Agonisten (De Saint Jan et al., 2001), wohingegen nach der Expression von GlyRs in HEK293 Zellen β -Alanin und Taurin als volle Agonisten fungieren (Lynch et al., 1997; Bormann et al., 1993).

1.3 Der γ -Aminobuttersäure Rezeptor (GABA_AR)

Die inhibitorische Neurotransmission im Gehirn wird vorwiegend durch die Aktivierung von GABA_ARs mittels γ -Aminobuttersäure (GABA) mediiert. Ein Drittel aller Neurone im ZNS benutzen GABA als primären Neurotransmitter. Die meisten der GABAergen Neurone sind Interneurone und dadurch in der Lage der Exzitabilität in lokalen Kreisläufen entgegenzusteuern (Vithlani et al., 2011). Weiterhin kann GABA auch langsame metabotrope G-Protein gekoppelte GABA_BRs aktivieren, welche indirekt Kalzium oder Kalium - Kanäle aktivieren und somit eine verlängerte inhibitorische Antwort bewirken (Bettler et al., 2006). Veränderungen in der GABAergen Transmission können zu vielen neurologischen und mentalen Störungen führen wie z.B. Epilepsie (Hirose et al., 2003; Scheffer und Berkovic, 2003), Angstsyndrome (Malizia, 2002), Angelman-Syndrom (Dan und Boyd, 2003) und Schizophrenie (Wassef et al., 2003). GABA_ARs sind klinisch relevant als Ziel der Medikation. Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroiden und Alkohole können entkrampfend und angstlösend wirken (Sieghart, 2006).

GABA_ARs gehören zur Familie der Cys-loop Liganden gesteuerten Ionenkanäle und agieren, genauso wie der GlyR, als inhibitorischer Kanal in der Postsynapse. Bislang konnten 21 GABA_AR Untereinheiten des zentralen Nervensystem von Säugern kloniert

und sequenziert werden. Diese wurden in 8 verschiedene Klassen auf der Basis ihrer Sequenzidentität eingeteilt: $\alpha(1-6)$, $\beta(1-3)$, $\gamma(1-3)$, δ , ϵ , π , θ , $\rho(1-3)$. Untereinheiten innerhalb einer Klasse sind zu ca. 70% sequenzidentisch. Zwischen den einzelnen Klassen fällt die Homologie jedoch auf ca. 30-40%. Ebenfalls konnten alternative Splice – Varianten für einige dieser Untereinheiten gefunden werden wodurch sich die Diversität an möglichen GABA_AR Zusammenstellungen noch erhöht (Sieghart et al., 1999). Beispielsweise existiert die $\gamma 2$ Untereinheit in einer kurzen ($\gamma 2S$) und einer langen ($\gamma 2L$) Variante, welche sich durch ein 8 Aminosäuren großes Insert in der intrazellulären Schleife voneinander unterscheiden (Kofuji et al., 1991; Whiting et al., 1990).

GABA_ARs mit unterschiedlicher Untereinheiten Zusammenstellung können differenzielle Eigenschaften in der Pharmakologie und des „channel gatings“ besitzen, werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Entwicklung exprimiert und können in unterschiedlichen Gehirnregionen akkumulieren (Luscher et al., 2011). Trotz der Fülle der Möglichkeiten GABA_ARs durch die verschiedenen Untereinheiten zu assemblieren ist tatsächlich nur eine limitierte Anzahl von Untereinheiten – Kombinationen in der neuronalen Plasmamembran lokalisiert. Die größte Population von GABA_ARs im Gehirn besteht aus der Komposition $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ gefolgt von $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ mit der Stöchiometrie von $2\alpha:2\beta:1\gamma$ (Farrar et al., 1999).

1.4 Die Rolle von Gephyrin und Collybistin bei der Anreicherung von GlyRs und GABA_ARs in der postsynaptischen Membran

1.4.1 Gephyrin

Die schnelle synaptische Übertragung im Nervensystem wird durch Liganden – gesteuerte Ionen – Kanäle reguliert, welche in der postsynaptischen Membran stark angereichert vorkommen. Das Gerüstprotein Gephyrin ist für die Lokalisierung von GlyRs und GABA_ARs an der inhibitorischen Postsynapse essenziell (Kneussel und Betz,

2000; Moss und Smart, 2001). Weiterhin führt das Ausschalten der Gephyrin Genexpression durch antisense Oligonukleotide in kultivierten Neuronen oder Gephyrin knockout bei der Maus zu einer stark verminderten GlyR Anreicherung (Kirsch und Betz, 1993; Feng et al., 1998). Ebenfalls betroffen sind die aus $\alpha 2$ - oder γ - Untereinheiten aufgebauten GABA_ARs (Essrich et al., 1998; Kneussel et al., 1999). Das Gerüstprotein Gephyrin wurde mittels Affinitäts - Chromatographie durch Ko - Aufreinigung mit dem GlyR identifiziert (Pfeiffer et al., 1982). Gephyrin besitzt ein Molekulargewicht von 93kDa und besteht aus drei großen Domänen (Abb.1.2): Die N - terminale G - Domäne wird über eine zentrale linker Region (C - Domäne) mit der C - terminalen E - Domäne verknüpft. Die G - Domänen können Trimere ausbilden (Sola et al., 2001) und die E - Domänen sind fähig zu dimerisieren (Sola et al., 2004).

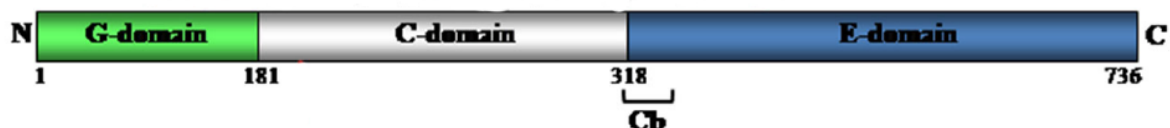


Abb.1.2: Schematischer Aufbau von Gephyrin. Dargestellt sind die N-terminale G-Domäne (grün;1-181AA), die zentrale Linkerregion (grau;181-318AA) und die C-terminale E-Domäne (blau;318-736AA)). Die Collybistin - Binderegion befindetet am Anfang der E-Domäne. (modifiziert nach Zacchi et al., 2014)

Aufgrund der Oligomerisierungsfähigkeiten der G - und E - Domäne (Abb.1.3) wird angenommen, dass sich unterhalb der Membran eine hexagonale Matrix ausbildet (Kneussel und Betz, 2000; Sola et al., 2004).

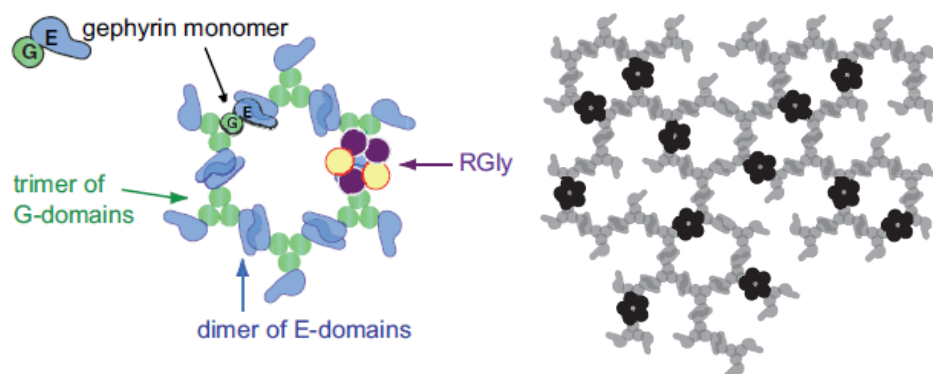


Abb.1.3: Dargestellt ist die Gephyrin mediierte hexagonale Matrix und die daran beteiligten Gephyrin - Domänen. Die E - Domänen (blau) besitzen die Fähigkeit zu dimerisieren und die G - Domänen (grün)

zu trimerisieren. Im Dimerisierungsinterface der E – Domänen entstehen hochaffine Bindestellen für die GlyR β – Untereinheit (links). Die Einbettung der GlyRs in die hexagonale Matrix ist auf der rechten Seite abgebildet. (Dumoulin et al., 2009)

Es konnte gezeigt werden, dass Gephyrin Aggregate mit dem Mikrotubuli Organisationszentrum (MTOC) – Marker γ – Tubulin (Maas et al., 2006), dem Aktin – bindenden Protein ena/VASP und γ – Aktin kolokalisieren (Bausen., 2006). Demzufolge scheint Gephyrin mit den Zytoskelett – Strukturen wechselzuwirken. Neben der spezialisierten Funktion in Neuronen nimmt Gephyrin außerdem eine fundamentale Rolle im Metabolismus ein und katalysiert die finalen Schritte in der Molybdän Ko-Faktor (Moco) Biosynthese (Feng et al., 1998; Stallmeyer et al., 1999). Moco ist ein Co-Faktor für die Sulfat - Oxidase, Aldehyd - Oxidase und Xanthin – Oxidoreduktase (Schwarz, 2005). Aus diesem Grund wird Gephyrin ubiquitär und nicht Neuronen – spezifisch exprimiert. Einige Proteine wie z.B Cinnamon (*Drosophila*), MogA und MoeA (*E.coli*) und Cnx1 (*Arabidopsis*) zeigen eine hohe Homologie zur Primärsequenz von Gephyrin und sind in den jeweiligen Organismen auch als Moco aktiv. Interessanterweise kann eine defekte Moco – Biosynthese in Bakterien, Pflanzen und kultivierten Säugerzellen durch Gephyrin wieder hergestellt werden (Stallmeyer, et al., 1999).

1.4.2 Collybistin

Ein Hefe – Zwei – Hybrid - System Screen mit Gephyrin identifizierte ursprünglich zwei Collybistin Spleiß – Varianten (Cb I und Cb II), welche beide eine dbp – Homologe (DH) und eine pleckstrin – Homologe (PH) Domäne besitzen (Kins et al., 2000). Die DH – Domäne katalysiert den Austausch von GDP zu GTP bei der kleinen GTPase Cdc42 (Reid et al., 1999). Aus diesem Grund zählt Collybistin auch zur Familie der GEFs (guanine-nucleotide-exchange-factor). Die PH – Domäne von Collybistin interagiert spezifisch mit Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) (Kalscheuer et al., 2009). Collybistin I und Collybistin II der Maus unterscheiden sich in der C-terminalen Region (Kins et al., 2000). Die längere Collybistin I – Variante enthält ein Segment im C-terminalen Bereich welche vermutlich eine Coiled Coil Struktur ausbilden kann. Diese ist bekannt dafür Protein Interaktionen zu medieren. Im Jahr 2004 identifizierten Harvey et al. eine

dritte splice Variante, Collybistin III, welche ebenfalls einen anderen C-Terminus besitzt. Dabei sind 59 von 60 Aminosäuren des C-Terminus homolog zu der humanen Collybistin – Variante (hPEM-2). Eine zweite Region der Variation von Collybistin ist der N-Terminus. Die N-terminale Region von Collybistin I beinhaltet eine zusätzliche Src Homologie 3 (SH3) – Domäne, wohingegen für Collybistin II zwei splice Varianten detektiert wurden, eine besitzt die SH3 – Domäne (Cb II SH3+) wohingegen die andere (Cb II SH3-) die SH3 – Domäne nicht beinhaltet. Die SH3 – Domäne agiert als auto – inhibitorische Domäne und belässt Cb I, Cb II SH3+ und Cb III in einer inaktiven Konformation (Abb.1.4).

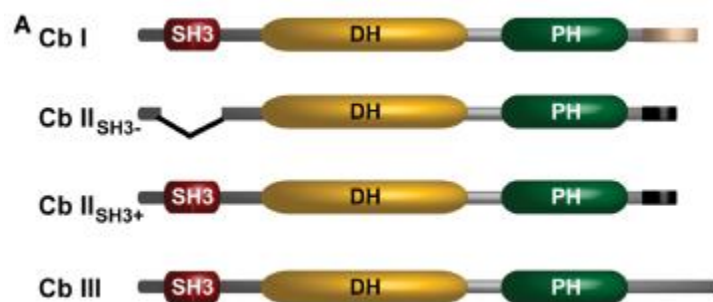


Abb.1.4: Dargestellt ist die Domänen – Struktur der vier splice Varianten von Collybistin. Die SH3 – Domäne (rot), die DH – Domäne (gelb) und die PH – Domäne (grün) sind beginnend vom N-Terminus zum C-Terminus eingezeichnet. Collybistin I, Collybistin II SH3+ und Collybistin III besitzen die SH3 – Domäne. Ausnahme ist hierbei die splice Variante Collybistin II SH3-, welcher die SH3 – Domäne fehlt. (Papadopoulos et al., 2011)

Nach Ko – Expression von GFP – Gephyrin und myc - Collybistin II SH3+ in einer Säugerzelllinie konnte eine Ko – Lokalisierung der beiden Proteine in großen intrazellulären Aggregaten aufgezeigt werden. Wird Collybistin II SH3- statt Collybistin II SH3+ in der Säugerzelllinie Ko – exprimiert kommt es zu einer Umverteilung von Gephyrin, nahe der Plasmamembran, in Mikrocluster (0,2 - 0,5µm Durchmesser). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass Collybistin II SH3- submembranöse Gephyrin – Mikroaggregate induzieren könnte, welche wiederum die Anordnung der GlyR – Cluster in der Plasmamembran beeinflussen (Kins et al., 2000).

1.4.3 Die Rolle von Neuroligin bei der Anreicherung von Gephyrin und Collybistin unterhalb der Plasmamembran

Ein weiteres wichtiges Protein für die Reifung der Synapse und Verankerung der GlyRs und GABA_ARs in der Plasmamembran ist Neuroligin (NL). Bislang wurden 4 verschiedene NLs (1-4) identifiziert. Diese gehen eine Wechselwirkung mit präsynaptisch verankerten Neurexinen (NX) ein und werden deshalb als Zelladhäsionsproteine klassifiziert (Ullrich et al., 1995; Varoqueaux et al., 2006). Bei glutamatergen Synapsen können die Neuroligine eine Interaktion mit dem Gerüstprotein PSD-95 eingehen. Am besten beschrieben ist die Funktion von Neuroligin 1 bei exzitatorischen Synapsen. Eine Deletion von Neuroligin 1 zeigt deutliche Defizite in der exzitatorischen Signalübertragung, hat jedoch keine Auswirkung auf die inhibitorische Signalübertragung (Chubykin et al., 2007). Zwar besitzen NL1-4 alle eine Bindestelle für das an inhibitorischen Synapsen vorkommende Gephyrin, jedoch nur NL2 und NL4 zusätzlich noch eine Interaktionsmöglichkeit mit Collybistin. NL2 bindet Gephyrin durch ein konserviertes zytoplasmatisches Motiv und agiert dabei als ein spezifischer Aktivator für Collybistin, wobei die Bindestelle für das Neuroligin in der SH3 – Domäne von Collybistin liegt (Poulopoulos et al., 2009).

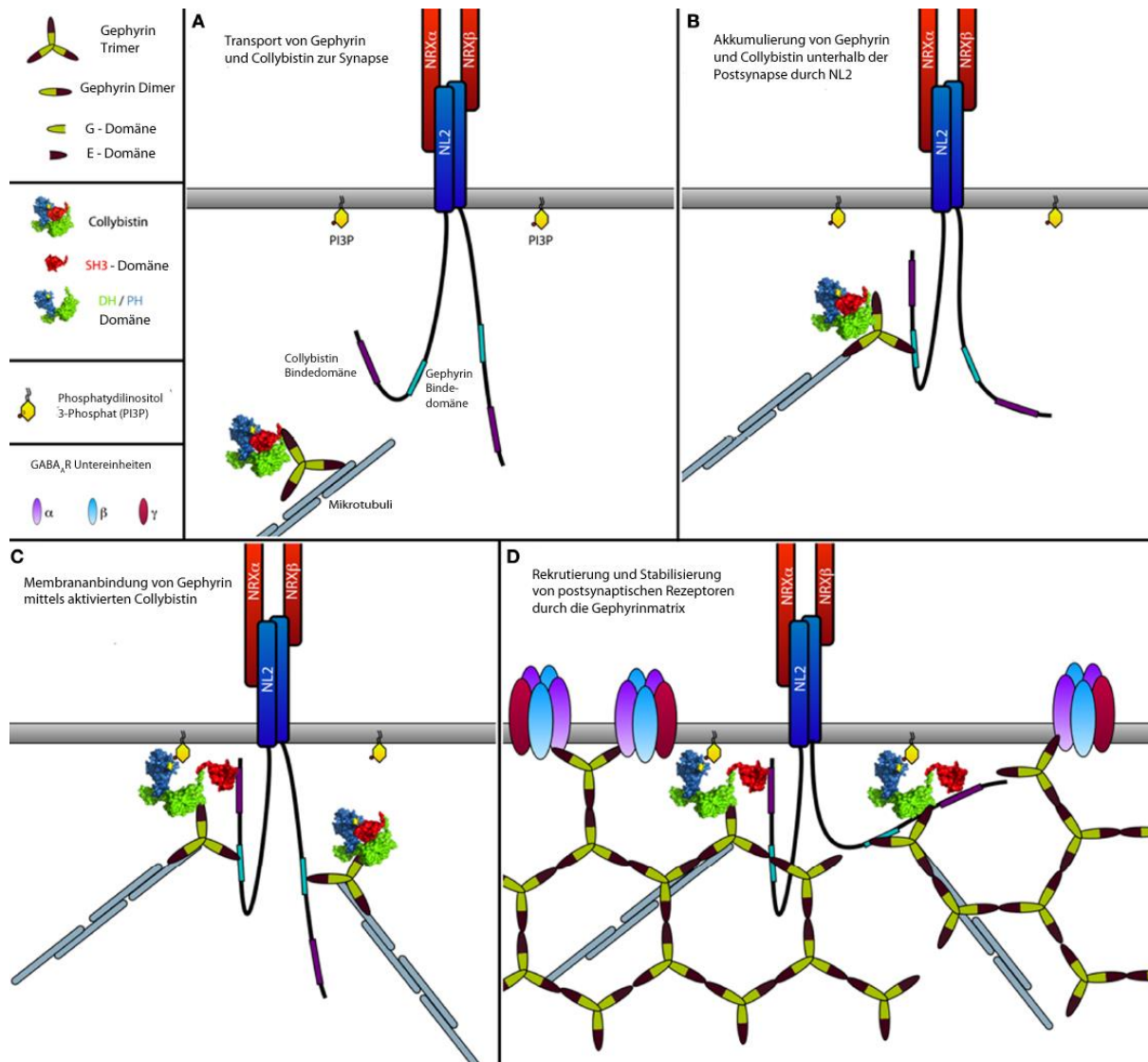


Abb.1.5: Modell der NL2 induzierten Aktivierung von Collybistin an der inhibitorischen Postsynapse. (A) Gephyrin Trimere sind mit Cb assoziiert und werden entlang von Mikrotubuli zu submembranösen Bereichen transportiert. Während des Transports behält Cb eine geschlossene Konformation. In der geschlossenen inaktiven Konformation wird sowohl die katalytische Aktivität der DH – Domäne als auch die Bindung der PH – Domäne an membranständige Phosphoinositide durch die sterische Hinderung der SH3 – Domäne unterdrückt. (B) An der Postsynapse reichern sich NL2 – Moleküle durch präsynaptisch exprimiertes Neurexin (NRX) an und interagieren vorübergehend mit dem Gephyrin – Cb Komplex. Diese Interaktion bringt die Prolin - reiche zytoplasmatische Domäne von NL2 in die nähere Umgebung der SH3 – Domäne von Cb. (C) Eine typische SH3 – Domäne – Liganden Interaktion mediert durch ein PXXP – Motiv in der zytoplasmatischen Domäne von NL2 führt zu einer strukturellen Reorganisation von Cb. Das Resultat ist eine offene Konformation. Die Transition zum offenen Status erlaubt nun der PH – Domäne mit PI3P – reichen Domänen der Plasmamembran zu interagieren. Zusammen mit Cb wird Gephyrin zu den PI3P – reichen Regionen Ko – rekrutiert . (D) GABA_ARS werden zum wachsenden postsynaptischen Verankerungsgerüst rekrutiert. (modifiziert nach Papadopoulos und Soykan, 2011)

Zwei Jahre später konnte dies ebenfalls für NL4 gezeigt werden (Hoon et al., 2011). Ein Modell wie NL2 Collybistin an inhibitorischen Synapsen aktivieren könnte hat die Arbeitsgruppe um Papadopoulos 2011 entwickelt (Abb.1.5).

Ziel der Arbeit:

Das Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Pharmakologie und Lokalisation von inhibitorischen Rezeptoren der nAChR-Familie nach heterologer Expression mit den zytoplasmatischen Gerüstproteinen Gephyrin, Collybistin und Neurologinen. Weiterhin sollte der Einfluss zytoplasmatischer Wechselwirkung auf die funktionellen Eigenschaften der Rezeptoren untersucht werden. Bis heute ist der Einfluss der Verankerungsproteine Gephyrin und Collybistin auf die Rezeptoreigenschaften des GlyRs und GABA_ARs kaum untersucht. In diesem Zusammenhang sollten auch der Einfluss der Gephyrin – und Collybistin Domänen auf einen möglichen pharmakologischen Effekt untersucht werden. Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (engl. TEVC) sollten Eigenschaften wie apparente Affinität und Gesamtzellströmenach heterologer Expression analysiert werden. Weiterhin sollte der Einfluss von Gephyrin und Collybistin auf die Verteilung der GlyRs in der Oozytenmembran mit Hilfe der konfokalen Laserraster – Mikroskopie (eng. CLSM) ermittelt werden.

2.2.2 Sonstige verwendete Enzyme

Tabelle 2.2: Enzyme für Molekulare- und Biochemische Arbeiten

Enzym	Konzentration	Firma
Kollagenase Typ II	0,5 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sp6 RNA-Polymerase	50 U/μl	Ambion
Endoglykosidase H	500 U/ml	NEB, Frankfurt/Main
PNGase F	500 U/ml	NEB, Frankfurt/Main

2.3 Marker

2.3.1 DNA-Längenstandard

Folgende Fragmente enthielt der DNA-Längenstandard (Eurogentec, Seraing, Belgien) in kb: 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2.

2.3.1 Proteinstandard

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde der SeeBlue Plus2 Proteinstandard (Karlsruhe) verwendet.

2.4 Kits

Tabelle 2.3: Verwendete Kits

Kit	Firma
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Ambion mMessage mMachine [®]	Ambion, Huntington, UK
Min Elute [™] Reaction Cleanup Kit	Qiagen, Hilden

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Bakterienkultur

LB-Medium	0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Tryptone, 1 % (w/v) NaCl
-----------	---

LB-Agar	0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Tryptone, 1 % (w/v) NaCl, 1,5 % (w/v) Agar
---------	---

Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml in ddH ₂ O
EDTA 500 mM	18,61 g
SDS	10 % (w/v)
TAE 50x	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
TBE 10x	108 g Tris, 15,5 ml Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
TE 10 mM	Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8)
Tris-HCl 1 M	60,57 g/500 ml, pH 7,4 1,5 M 90,855 g/500 ml, pH 8,8 0,5 M 30,285 g/500 ml, pH 6,8

Lösungen für elektrophysiologische Studien

1xND96-Lösung 96 mM	NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 5 mM HEPES pH 7,4
Ringer-Lösung	115 mM NaCl, 1,8 mM CaCl ₂ , 1 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7,4
Glyzin-Stocklösung 1M	in ddH ₂ O gelöst; Verdünnungsreihe mit Ringer hergestellt

Lösungen für biochemische Arbeiten

Bindungspuffer	Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0),
n-Dodecyl-β-D-Maltosid	0,5 % (w/v)
DTT 2 M	308,4 mg/ml in ddH ₂ O
Elutionspuffer 20 mM	Tris (pH 7,4), 0,5 % (w/v) n-Dodecyl-β-D-Maltosid, 10 mM EDTA, 100 mM Imidazol (pH 8,0)
Homogenisierungs- und	

Waschpuffer	Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0), 0,1 % (w/v) n-Dodecylβ-D-Maltosid, 100 μM (1μl/1ml) Pefabloc
ImidazolLösung 1 M	3,4 g in 50 ml H ₂ O, pH 8.0
Na-Phosphat Dihydrat-Lösung 1 M	44,5 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O in 250 ml H ₂ O
Na-Dihydrogen-Phosphat-Monohydrat-Lösung 1 M	34,5 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O in 250 ml H ₂ O
Na-Phosphat-Puffer	46,6 ml Na ₂ HPO ₄ 1 M, 3,4 ml NaH ₂ PO ₄ 1 M, auf 500 ml 0,1 M, pH 8,0 mit H ₂ O auffüllen
Octylglucopyranosid 10 %	
SDS	10 % (w/v)

SDS-PAGE

SDS-Laufpuffer 1x	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer 5x	300 mM Tris-HCl, 5 % SDS, 50 % Glycerin, 100mM DTT, 0,1 % Bromphenolblau
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
Acrylamid	SDS-Page: 40 %, (29:1) Acrylamid 38,67 %, 1,33%
Saccharoselösung 40 % (v/v)	40 g in 100 ml H ₂ O lösen
Fixierlösung	10 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Methanol

Radioaktivität

[³⁵S] Methionin, Hartmann Analytik (Braunschweig)

2.6 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt) und Biotrend (Zürich, SUI) bezogen.

2.7 Material und Geräte

Tabelle 2.4: Genutztes Material

Material	Hersteller
Kodak® BioMax MR Film, MR-1, Size: 5 in. X 7 in	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Sterilfiltrierer (200ml)	Nalgene (Darmstadt)
Spritzen (5-/ 10-/ 15 ml)	B. Braun (Melsungen)
Petrischalen	VWR International (Darmstadt)
Pasteurpipetten	VWR International (Darmstadt)
Handschuhe	Microflex (Hamburg)
Falcon Reaktionsgefäße	Orange Scientific (Belgien)
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Elektrodenkapillaren aus Borosilikatglas	WPI (Berlin)
Einmalskalpelle Cutfix®	B. Braun (Melsungen)

Tabelle 2.5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
AC210 S Analysewaage	Sartorius (Göttingen)
Autoklav Systec V-65	Biomedis (Gießen)
Binokular Leica Wild M3Z	Leica (Wetzlar)
Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia (Ratingen)
Inkubator	Binder (Deutschland)
Magnetrührer IKAMAG RCD	IKA-Labortechnik (Staufen)
Mikromanipulator MD4	Bachofer (Reutlingen)
Mikroschmiede MF-83	Bachofer (Reutlingen)
Nanodrop ND-1000	Nanodrop Technologies (Wilmington, USA)
pH-Meter CG 40	Schott (Mainz)
Zweistufen-Vertikalelektroden-Puller	Narashige (Tokio, Japan)
Schüttler G25	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Speedcav Savant	Fischer Laborbedarf (Essen)
Thermostat 5320	Eppendorf (Hamburg)
Digidata 1322A	Axon Instruments (Sunnyvale, USA)
GeneClamp 500B	Axon Instruments (Sunnyvale, USA)
HS180	Axon Instruments (Sunnyvale, USA)
HS160	Axon Instruments (Sunnyvale, USA)
UV- Gel Doc	Sanofi Aventis (Frankfurt)
Vortexer Reax 2000	Heidolph (Schwabach)

Zentrifugen:

Biofuge pico	Heraeus (Schwabach)
Fresco 21	Heraeus (Schwabach)
Fresco	Heraeus (Schwabach)
Multifuge 3S-R	Heraeus (Schwabach)
Milli Q	Millipore (Schwalbach)

Tabelle 2.6: Verwendete Programme

Software	Hersteller
Clampex 9.2	Synergy Software
Clampfit 9.2	Synergy Software
Kaleidagraph 4.0	Synergy Software
GraphPad Prism 5.01	Statcon

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Hitzetransformation

Für die Hitzetransformation wurden 45µl XL10-Gold® ultrakompetente Zellen (Stratagene) pro Ansatz, auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2µl β-Mercaptoethanol zu den Eppendorf-Reaktionsgefäßen hinzugefügt und nach sanftem Mixen des Ansatzes für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 2µl DNA hinzugefügt und nach vorsichtigem Vermischen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde die NYZ⁺-Lösung auf 42°C vorgewärmt. Darauf folgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C im Thermostat. Zu jedem Ansatz wurden 0,5ml vorgewärmte NYZ⁺-Lösung hinzugegeben und bei 37°C und 225-250rpm für 1 Stunde, mittels Thermoschüttler, inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien von den Platten gepickt und in 50 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und anschließend für 12-16 Stunden in den Schüttler bei 37°C wachsen gelassen.

3.1.2 Gewinnung von Plasmid-DNA durch Isolierung aus E.coli Kulturen mittels Qiagen-Kits

Für die Plasmidpräparation wurde das Midi/Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mittels des beigelegten Protokolls des Herstellers durchgeführt.

3.1.3 Midipräparation

Aus der gewachsenen Übernachtskultur wurden 50ml entnommen und bei 4°C mit 4000rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das

Bakterien-Pellet mittels 4ml des Puffers P1 durch mehrmaliges hoch- und runterpipettieren resuspendiert. Die Zellen wurden nun, durch 4ml des Puffers P2, einer alkalischen Lyse unterzogen (als Kontrolle der Lysierung diente das in Puffer P1 hinzugefügte Lyse Blue Reagenz) und wurden anschließend, nach 4-6 maligen vorsichtigen invertieren, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei zu kräftigen invertieren würde es zu Scherkräften kommen, welche die Plasmid-DNA beschädigen könnte. Nun wurden 4ml des neutralisierenden Puffers P3 zu dem Lysat pipettiert, welches für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, mit 4000rpm für eine Stunde bei 4°C, um Zelltrümmer, chromosomale DNA und Proteine zu entfernen. Der Überstand wurde in Qiagen-tips 100 überführt, welche zuvor durch 4 ml des Puffers QBT equilibriert wurden. Nun wurde die Anionenaustauscher-Säule mit 20 ml des Puffers QC gewaschen und die DNA anschließend mittels 5ml des Puffers QF von der Säule eluiert. Die eluierte DNA wurde durch applizieren von 3,5 ml Isopropanol präzipitiert und mit 4000rpm für eine Stunde bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das DNA-Pellet wurde mit 2ml 70% Ethanol gewaschen und anschließend mit 4000rpm für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nochmals wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet für 5-10 Minuten an der Luft getrocknet. Die pelletierte DNA wurde in 50µl Sigma Wasser resuspendiert.

3.1.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Durch die Agarosegelelektrophorese ist die Möglichkeit gegeben DNA-Fragmente im Bereich von 0,1- bis 20kb aufzutrennen. Dabei kann man die Auftrennungsleistung dieses Verfahrens durch die Agarosekonzentration steuern. In dieser Arbeit wurden Gele mit 1% (w/v) Agarose verwendet, wodurch eine wirkungsvolle Auftrennung der linearisierten DNA-Fragmente gewährleistet wurde. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die benötigte Menge an Agarose eingewogen und in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis keine Schlierenbildung mehr sichtbar war. Nach kurzem Abkühlen des Agarose-TAE-Puffer Gemisches auf ca. 60 °C wurde dieses in eine

Gelkammer, möglichst luftblasenfrei gegossen. Nun wurde ein Kamm in der Gelkammer platziert, damit sich befüllbare Taschen für die DNA nach der Polymerisation der Agarose, ausbilden konnten. Nach dem Auspolymerisieren der Agarose wurde der Kamm vorsichtig gezogen und das Gel in eine mit TAE-Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer überführt. Zum beladen der Taschen wurde die DNA mit einem Ladepuffer im Verhältnis eins zu sechs versetzt. Dieser erhöht die Dichte der aufzutragenden Proben und erleichtert somit das Absinken der DNA in der jeweiligen Geltasche und dient ebenso als visuelle Kontrolle durch das Anfärben der Proben. Die Gelelektrophorese erfolgte nach Anlegen der Spannung (ca. 10 V/cm) für 1-2 Stunden bei RT. Um die nun aufgetrennten Banden zu visualisieren wurde das Gel für 15 Minuten in eine Ethidiumbromid-Lösung mit einer Konzentration von 0,5µg/ml überführt. Der Farbstoff interkaliert dadurch zwischen die Basen, verschiebt sein Absorptionsspektrum, und fluoresziert nach Anregung durch UV-Licht intensiver als ungebundene Ethidiumbromid-Moleküle. Die Detektion und Dokumentation der Banden wurde mittels UV-Licht der Wellenlängen 254nm oder 302nm durchgeführt.

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer über die Messung der Absorption (A) bei einer Wellenlänge von 260 nm auf der Grundlage des Lambert-Beersches-Gesetzes ($E(LB) = \epsilon \times c \times d$) bestimmt. Dabei steht „ ϵ “ für den Extinktionskoeffizienten, „ c “ für die Konzentration der Lösung und „ d “ für die Küvettendicke. Das Wasser, in welcher die Nukleinsäure gelöst und gelagert wurde, wurde als Nullwert gesetzt. Aus den gemessenen Werten wurden die Konzentrationen der Nukleinsäurelösungen berechnet. Für RNA entspricht eine Absorption bei 260 nm Wellenlänge (A_{260}) von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml, für DNA 50 µg/ml. Zusätzlich kann durch das A_{260}/A_{280} -Verhältnis eine Aussage zum Reinheitsgrad einer Nukleinsäurelösung gemacht werden, da Proteine monochromatisches Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren. Bei einer optischen Dichte von $< 1,8$ liegt eine mögliche Kontamination mit Proteinen vor.

3.1.6 Linearisieren der DNA mittels Restriktionsenzym Not I

Bei dieser Methode wurde das Restriktionsenzym Not I, ein Restriktionsenzym dessen Erkennungssequenz gleichzeitig die Schnittstelle ist, verwendet. Zuerst wurde für das Linearisieren das Volumen an DNA ausgerechnet, welches eingesetzt werden musste, um im Gesamtansatz 10µg zu erhalten. Da der Gesamtansatz pro Probe 50µl betrug und die Volumina an Puffer H und Not I konstant gehalten wurden, musste die sich ergebende Diskrepanz durch ddH₂O ausgeglichen werden. Anschließend wurde der Ansatz zusammen pipettiert und bei 37°C Overnight verdaut. Eine positive Eigenschaft dieses Enzyms ist die Abwesenheit von Star-Aktivität, wodurch auch ein längerer Verdau möglich ist.

Tabelle 3.1: Linearisierungsprotokoll

eingesetzte Volumina [µl]		Bemerkung
Puffer H	5	
DNA	10	→ kann variieren
Not I	2	10Units/µl
ddH ₂ O	33	→ kann variieren

Darauf folgte eine Inaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 65°C. Anschließend wurde die linearisierte DNA mittels Min Elute Reaction Cleanup Kit von Nukleotiden, Salzen und Enzymen insbesondere von RNasen gesäubert. Zuerst wurden 300µl des Puffers ERC zu der enzymatischen Reaktion hinzugefügt. Die im Kit vorhandene Min Elute Säule, welche eine Silikat-Membran zum Binden der DNA besitzt, wurde in ein 2ml fassendes Sammelröhrchen gesteckt, worauf die DNA-beinhaltende Mischung appliziert wurde. Anschließend wurde das Sammelröhrchen samt Min Elute Säule für eine Minute mit 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte indem 750µl auf die Säule appliziert wurde und nach anschließender Zentrifugation (unter den oben genannten Bedingungen) der Durchfluss verworfen wurde. Um die immobilisierte DNA von der Säule zu eluieren wurden 10µl Sigma Wasser auf die Membran pipettiert.

3.1.7 Die *in vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde nach dem mMessage mMachine® SP6 Protokoll (Ambion) durchgeführt. Es wurde darauf geachtet alle Reagenzien des Kits bei Verwendung auf Eis zu halten, da besonders die Nukleotide und Enzyme labil sind. Außerdem wurde bei allen Arbeiten ein hohes Maß an Sauberkeit und Sterilität eingehalten um die Degradierung der RNA's durch RNasen vorzubeugen. Für eine hohe Stabilität und Translationseffizienz *in vivo* sorgt die 5'-Capstruktur [m7G(5')ppp(5')G].

Die vorher linearisierte und mittels der Gelelektrophorese auf Vollständigkeit des Verdauens analysierte DNA wurde nun in dieser Methode eingesetzt. Die einzelnen Komponenten für den Reaktionsansatz sind der Tabelle x zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Protokoll für cRNA-Synthese

	eingesetzte Volumina [µl]	Bemerkung
Sigma Wasser	y	→ kann variieren
NTP/CAP	10	
10x Reaktionspuffer	2	
DNA	x	→ kann variieren
SP6-Enzyme	2	
Ges. Volumen:	20	

***Das Volumina des eingesetzten Sigma Wassers orientiert sich daran wieviel µl DNA eingesetzt werden muss um in dem Gesamtansatz 1µg DNA zu erhalten.**

Die Komponenten für die cRNA-Synthese wurden nun zusammen pipettiert und bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde zu dem Ansatz noch 1µl DNase hinzugefügt und 20 Minuten inkubiert, um noch eventuell vorhandene DNA zu verdauen. Für die RNA Extraktion wurde die Methode der Lithium-Chlorid-Fällung angewendet, wodurch ungebundene Nukleotide, tRNA's und RNA's mit weniger als 300 Nukleotiden sowie die meisten Proteine nicht gefällt werden. Zuerst wurden jeweils 30 µl Sigma H₂O-und LiCl zu dem Ansatz hinzugefügt und durch mehrmaliges hoch- und runter pipettieren gründlich vermischt um anschließend die RNA bei -20°C über Nacht zu fällen. Am nächsten Tag wurde mit 13.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert um die RNA zu pelletieren. Da das RNA- Pellet schlecht zu detektieren ist, musste darauf geachtet in welcher Orientierung die Eppendorf-Reaktionsgefäße in die Zentrifuge gesteckt wurden. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand

sehr vorsichtig abgenommen und das Pellet einmalig mit 1ml 70% Ethanol resuspendiert. Um die maximale Anzahl von nicht gebundenen Nukleotiden zu entfernen folgte eine weitere Zentrifugationsrunde mit 13.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C. Das Ethanol wurde nun vollständig entfernt und das Pellet für 5 Minuten luftgetrocknet. Anschließend konnte das Pellet in 10µl Sigma H₂O resuspendiert und mittels NanoDrop® ND-1000 die Konzentration bestimmt werden. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die, für das Injizieren, gewünschte RNA-Konzentration eingestellt. Die Lagerung der RNA fand bei -70°C statt.

3.2 Elektrophysiologische Methoden

3.2.1 *Xenopus laevis* als Oozytenexpressionssystem

Klasse: Amphibia

Ordnung: Anura

Familie: Pipidae

Gattung: *Xenopus*

Wissenschaftlicher Name: *Xenopus laevis*

Xenopus laevis, der glatte afrikanische Krallenfrosch, lebt in Afrika südlich der Sahara (Angola, Namibia) und wird ca. 7 – 10cm groß (Abb. 3.1). Der Frosch ist dorsal gekennzeichnet durch eine oliv-braune Pigmentierung während ventral eine hell-beige Färbung vorliegt. Die Vorderbeine besitzen jeweils vier Finger und sind bei diesem Tier wenig entwickelt, jedoch werden sie zur Nahrungsaufnahme verwendet, da *Xenopus laevis* zur Gattung der zungenlosen Frösche gehört. Die Hinterbeine sind auffallend muskulös, was den Frosch zu einem hervorragenden Schwimmer macht, besitzen fünf Zehen wobei die drei inneren mit kräftigen, schwarzen Hornkrallen versehen sind, die der Gattung ihren Namen gaben.



Abb. 3.1: *Xenopus laevis*

Schon früh wurde er als Versuchstier eingesetzt. Bis Mitte der 1960er Jahre wurde er als Schwangerschaftstest – Organismus benutzt. In der heutigen Zeit hat er sich als Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie etabliert, da das Erbgut vollständig entschlüsselt wurde. Außerdem stellen die Oozyten ein ideales Expressionssystem für Ionenkanäle und ligandengesteuerte Kanäle dar, da diese selbst kaum auf ihrer Oberfläche vorhanden sind und die Expression von Fremd-cRNA problemlos und schnell erfolgt.

Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurden Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem für den humanen GlyR benutzt. Die Oozyten durchlaufen VI – Reifestadien, wobei für elektrophysiologische Studien die Stadien V und/oder VI geeignet sind. Die Oozyten sind in diesem Stadium 1 – 1,4mm groß und haben zwei, sich deutlich voneinander unterscheidende, Pole. Der vegetative Pol ist dotterreich und hell, wohingegen der animale Pol, welcher dotterarm ist, eine braune bis schwarze Farbe annimmt. Die dunkle Färbung des animalen Pols kommt durch Melanin Einlagerungen zustande welche die Oozyte vor UV-Licht schützen soll (Abb. 3.2).

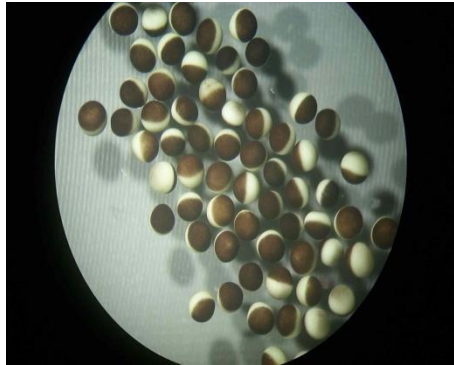


Abb. 3.2: Oozyten von *Xenopus laevis*

3.2.2 Haltung der Frösche

Die Weibchen, welche zwischen 2-4 Jahre alt waren, wurden in Aquarien mit einem Fassungsvermögen von ca. 200L gehalten. Es wurde darauf geachtet frisch-operierte von nicht operierten Fröschen zu trennen. Der für die Frösche wichtige Tag/Nachtrhythmus (16/18h) wurde über die Lichtautomatik geregelt. Ebenso wurde die Wassertemperatur konstant auf 20°C gehalten und über einen Aktivkohlefilter konnte das Wasser frisch aufbereitet werden. Die Fütterung erfolgte 2-3 mal in der Woche mit einem Spezialfutter (Altromin).

3.2.3 Entnahme und Präparation der Oozyten

Der mit einer 0,1 % (w/v) Tricain-Lösung (pH7,4) betäubte Frosch wurde auf einem mit Eis gefüllten Becken mit der Bauchseite nach oben gelegt. Es wurde nun über einen 1cm langen Schnitt zuerst die Hautschicht und anschließend leicht versetzt die Muskelschicht durchgeschnitten. Dies hatte zum Vorteil, dass die beiden Schichten getrennt zugenäht werden konnten. Nun wurde ein Teil des Ovars aus der Bauchhöhle gezogen und abgetrennt, welches in ND96⁺ - Lösung gegeben wurde. Nachdem dies erfolgte, wurde der Schnitt in zwei Schritten mit einem resorbierbaren Nahtmaterial genäht. Zuerst die Muskelschicht, dann die Hautschicht. Zum Aufwachen kam der Frosch ca. eine viertel Stunde in ein mit Wasser gefüllten Behälter ehe er ins OP-

Becken versetzt wurde. Nach Erholung von seinen Operationsstrapazen wurde der Frosch wieder in das Aquarium zu den anderen Fröschen zurückgesetzt.

Die entnommenen Oozyten wurden mittels einer Schere zu kleineren Ansammlungen zurechtgeschnitten. Um die Follikelzellschicht, welche die Oozyten noch umgibt, zu entfernen wurde eine Kollagenase des Typs IIA dazugegeben (Abb. 3.3).

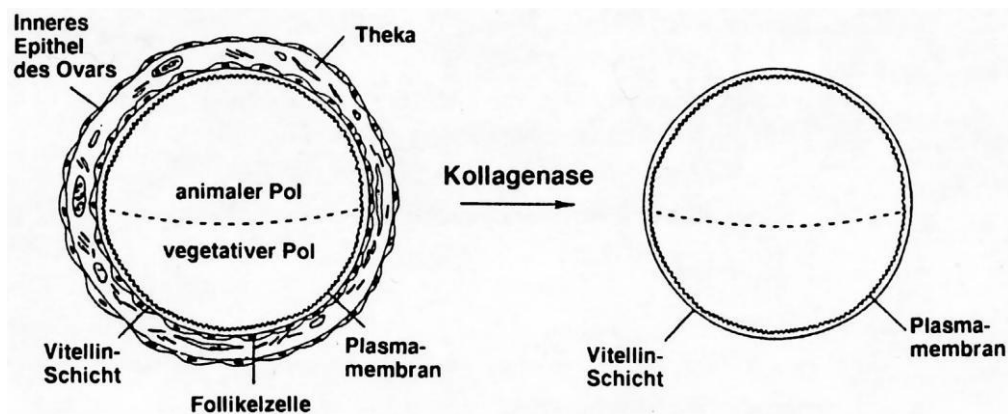


Abb. 3.3: Schematische Darstellung einer Oozyte von *Xenopus laevis* vor und nach einer Behandlung durch die Kollagenase des Typs (Quelle: aus Wellner; 1994)

Diese Methode kann auf zwei Arten durchgeführt werden, man kann die Kollagenase über Nacht verdauen lassen ($0,25\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oder man erhöht die Konzentration der Kollagenase und verkürzt damit die Inkubationszeit auf ca. 2 Std beim „Quick and Dirty“ – Verdau ($1\text{mg}/\text{ml}$). Um den Verdau zu stoppen, wurde die Kollagenase abgesaugt und anschließend in Ca^{2+} freier ND96^{+} - Lösung für 15 Minuten inkubiert, da Ca^{2+} die Kollagenase hemmt, und anschließend mit ND96^{+} - Lösung drei mal gewaschen. Nachdem die Waschschrte beendet waren, konnten unter dem Binokular die besten Oozyten für die folgende Injektion ausgesucht werden. Kriterien hierfür waren:

1. Das Stadium V-VI, identifizierbar über die Größe
2. Eine deutliche Abgrenzung zwischen dem vegetativen und animalen Pol
3. Keine Pigmentierungsstörungen der jeweiligen Hemisphären
4. Der Zellkern (welcher im animalen Pol liegt) darf nicht ausgetreten sein
5. Der Phänotyp der Oozyten sollte rund sein
6. Die Follikelzellschicht darf nicht mehr vorhanden sein

3.2.4 Herstellung von Injektionskapillaren

Die Injektionskapillaren wurden mit Hilfe eines Zweistufen-Vertikalelektroden – Pullers der Firma Narishige/Japan mit zwei unterschiedlichen Heizstufen gezogen. Dazu wurde das Borosilikatglas in den Puller eingespannt. Dieser erhitzte über eine Heizspirale das Borosilikatglas in der Mitte, welches, durch die Hitze, weich wurde und daraufhin mittels des angehängten Gewichts auseinander gezogen wurde und darauf zwei benutzbare Injektionskapillaren entstanden. Der Durchmesser der Kapillarenspitze wurde unter dem Mikroskop nachgeprüft und bei Bedarf auf 6-10 μ m korrigiert.

3.2.5 Injektion der cRNA

Für die Injektion der cRNA wurde ein Binokular und ein Mikroinjektor verwendet. Die zuvor gezogenen Injektionskapillaren wurden luftblasenfrei mit Immersionsöl gefüllt und auf den Metalldorn des Mikroinjektors gesteckt. Mit Blick durch das Binokular wurde die Spitze der Injektionskapillare abgebrochen. Anschließend wurde die cRNA auf den Deckel eines Nuklease-freien Eppendorf – Reaktionsgefäßes pipettiert und die Injektionskapillare, mit Hilfe der Mikromanipulatoren, in den RNA-Tropfen getaucht, welcher durch Anlegen eines Unterdrucks, durch den Mikroinjektor, in die Injektionskapillare aufgezogen wurde. Die für die Injektion selektierten Oozyten wurden in eine Plexiglasrinne mit dafür vorgesehenen Vertiefungen gelegt und unter das Binokular geschoben. Daraufhin wurde die mit cRNA befüllte Injektionskapillare nun unter ständiger sorgsamer Beobachtung mittels Binokular an die Oozyten herangeführt, und schließlich in die aufgereihten Oozyten eingestochen. Durch das Immersionsöl in der Injektionsnadel bildete sich eine deutliche Grenzschicht, die dazu diente präzise nur cRNA in die Oozyte zu injizieren. Durch Anlegen eines kurzfristigen Überdrucks durch den Mikroinjektor wurde pro Oozyte jeweils 50nl cRNA (100-300 μ g/ μ l), des zu untersuchenden Konstrukts, in die Oozyten gepumpt. Für eine elektrophysiologische Studie wurden die Oozyten anschließend für 16-40 Stunden bei 19°C inkubiert. Für biochemische Untersuchungen mittels SDS-Gels folgte zunächst

eine radioaktive Markierung der Oozyten von 12-48 Stunden und danach die Inkubation in einer nicht-radioaktiven 10 mM Methionin-Lösung.

3.2.6 Elektrophysiologische Ableitungen an Oozyten

3.2.6.1 Versuchsaufbau

In einem Faraday-Käfig aus Aluminium, welcher elektromagnetische Wellen und äußere magnetische Felder wie z.B von Steckdosen, von der Apparatur im Innenraum fernhielt befand sich ein gedämpfter Labortisch auf dem der Mess-Stand installiert wurde. Zu der Apparatur gehörten ein Binokular, eine dazugehörige LED-Leuchte, zwei in drei Raumrichtungen bewegliche Mikromanipulatoren, eine Plexiglasableitkammer mit einer eingefrästen Vertiefung für die zu untersuchenden Oozyten, ein Zu- und Ablauf für die elektronisch gesteuerte Perfusion der Badlösung, zwei Silberchloriddrähte welche als Strom- und Spannungselektroden dienten und an den Vorverstärkern HS 160 bzw. HS 180 befestigt wurden und eine Referenzelektrode die in dem Zulauf der Badlösung in der Plexiglasvertiefung angebracht wurde (Abb. 3.4).

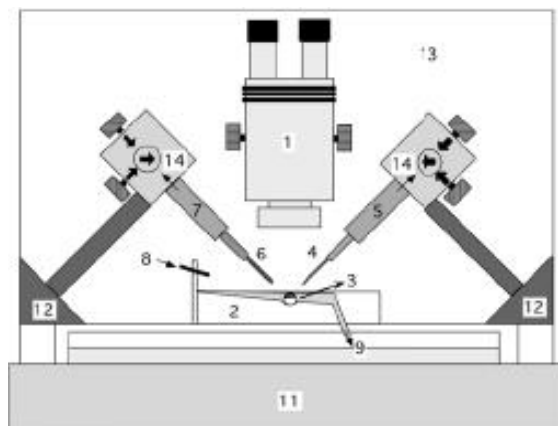


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Meßstandes für elektrophysiologische Ableitungen. Die Ziffern in der Abbildung stellen dar: (1) Binokular; (2) Plaxiglasableitkammer; (3) Referenzelektrode; (4) Spannungselektrode; (5) Vorverstärker HS 160 mit Ausgang zum Treiberverstärker VF 102; (6) Stromelektrode; (7) Vorverstärker HS-180 mit Ausgang zum Verstärker VF 102; (8) Zulauf der Badperfusion; (9) Abfluss der Badperfusion mit Auffangbehälter; (10) luftgefülltes Schwingungsdämpfungssystem; (11) Labortisch aus Marmor; (12) Säulen und Halterungen zur Befestigung der Mikromanipulatoren; (13) Farady-Käfig aus Aluminium; (14) mechanische Mikromanipulatoren beweglich in alle drei Raumrichtungen.

3.2.6.2 Theoretischer Hintergrund der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die unterschiedliche Verteilung von Ionen in von selektiv permeablen Membranen getrennten Kompartimenten führt zur Bildung eines Potentials. Das elektrochemische Potential von Zellen (V_m) gibt die Differenz zwischen intrazellulärem- und extrazellulärem Potential an. Das Membranpotential wird bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durch eine Spannungselektrode, welche in die Oozyte eingestochen wird, und einer Referenzelektrode in der Badlösung bestimmt. Zusätzlich wird eine Stromelektrode in die Oozyte eingestochen, dies gewährleistet die Messung transmembranärer Ströme mittels der Spannungs-Klemm-Methode. Die von Hodgkin, Huxley und Katz entwickelte Messmethode ermöglicht das Klemmen des Potentials auf einen willkürlichen Wert.

Im Detail:

Das Prinzip dieser Methode beruht auf einem Rückkopplungsmechanismus, hierbei wird vom Vorverstärker eine Kommandospannung (U_{com}) erzeugt und der für die Aufrechterhaltung applizierte Strom gemessen. Die Spannungselektrode misst passiv das über der Zellmembran anliegende Potential, während die Stromelektrode das Membranpotential (U_{mem}) aktiv reguliert. Das detektierbare Signal wird über den Vorverstärker HS (180) und einen Zweikanal Mikroelektrodenverstärker (VF 102) zum Differenzverstärker CA 100 geleitet. Dieser vergleicht nun die angelegte Kommandospannung (U_{com}) mit dem vorliegenden Membranpotential (U_{mem}) und erzeugt bei einer Differenz der beiden Werte die Klemmspannung (U_{clam}) welche im Treiberverstärker VF 102 in ein Stromsignal (I_m) übersetzt und über den Vorverstärker HS 160 zur Stromelektrode weitergeleitet wird. (Abb. 3.5)

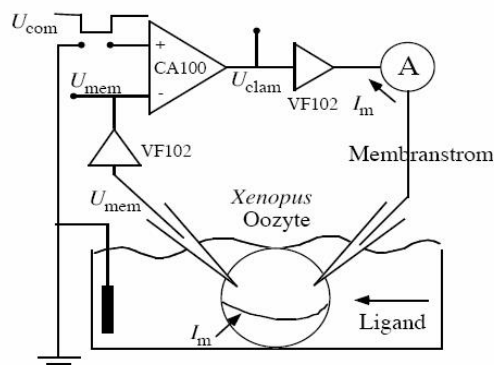


Abb.3.5: Schematische Darstellung des Schaltbildes des Voltage-Clamp-Experimentes. Das Membranpotential (U_{mem}) wird über den Vorverstärker in den Verstärker VF 102 zur Erfassung des Membranpotentials (U_{mem}) und von dort weiter zum Differentialverstärker CA100 geleitet. Hier wird die Differenz zwischen der Kommandospannung (U_{com}) und dem Membranpotential (U_{mem}) ermittelt und die benötigte Klemmspannung (U_{clam}), um die Differenz auszugleichen, erzeugt. Im nachgeschalteten Treiberverstärker wird die Klemmspannung (U_{clam}) in ein Stromsignal (I_m) übersetzt. Am Ausgang kann die Spannung als korrespondierendes Stromsignal abgefangen werden.

3.2.6.3 Herstellung der Ableitelektroden

Die Ableitelektroden wurden wie die Injektionskapillaren mit dem Zweistufen Vertikalelektroden-Puller von der Firma Narashige (Japan) hergestellt. Das hierbei verwendete Borosilikatglas der Firma WPI (Berlin) hat einen Durchmesser von 1,2mm. Der Durchmesser der Kapillarenspitze sollte bei ca. 2µm liegen und konnte bei Bedarf durch vorsichtiges Abbrechen unter dem Binokular korrigiert werden. Anschließend konnten die

Messkapillaren mit einer 3M Kalium-Chlorid-Lösung möglichst luftblasenfrei bis zur Hälfte gefüllt und sorgfältig auf die beiden Vorverstärker gesteckt werden. Für eine erfolgreiche Messung sollte der Widerstand, nach Eintauchen der Kapillarspitzen in die perfusionierte Ringerlösung, in dem Bereich von 0,5-2,0M liegen. Die Widerstände wurden zwischen den einzelnen Messungen auf den optimalen Wertebereich überprüft, wenn eine Abweichung auftrat wurde die Messkapillare ausgetauscht.

3.2.6.4 Chlorierung von Silberelektroden

Für die Chlorierung wurden die Silberdrähte zunächst mittels Schleifpapier

abgeschmirgelt und anschließend in eine 0,1 M Salzsäurelösung getaucht um diese elektrolytisch zu Silberchlorid zu oxidieren. Dazu wurde ein Elektrodendraht an die Anode (+) und ein weiterer an die Kathode (-) einer 1,5 V Batterie angeschlossen. Nach kurzer Zeit bildeten sich an dem Kathodendraht Luftbläschen, welche ein Indiz für einen geschlossenen Stromkreislauf waren, wohingegen der Elektrodendraht sich durch die Chlorierung dunkel verfärbte. Die beiden Drähte verblieben ca. 2 Minuten in der Salzsäurelösung.

3.2.6.5 Ablauf der Messungen

Nachdem alle Vorbereitungen abgeschlossen waren konnte mit der elektrophysiologischen Ableitung begonnen werden. Zuerst wurden die Messelektroden in die perfusionierte Badlösung getaucht um die Widerstände nochmals auf den optimalen Bereich (0,5-2,0M) überprüfen zu können. Anschließend wurde die Oozyte in die Vertiefung des Plexiglasbeckens gelegt und vorsichtig die Spannungs- und Stromelektrode eingestochen. Daraufhin wurde überprüft, ob die Oozyte ein natürliches Membranpotential zwischen -20mV bis -40mV aufweist und für die nachfolgende Messung geeignet ist. Für die Applikation der Lösungen, mittels einer Pipette, wurde der Ringerfluss, welcher beständig die Oozyte umspülte, ausgeschaltet und erst nach Beendigung der Applikation wieder aktiviert. Die Zeit zwischen den Applikationen variierte zwischen 50 und 200 Sekunden, je nach Konzentration des Agonisten bzw. Sättigung des Rezeptors. Die bei den Messungen erhaltenen Daten wurden durch das Programm Clampex 9.0 am Messrechner aufgezeichnet und konnten später mit dem dazugehörigen Programm Clampfit 9.0 ausgewertet werden.

3.2.6.6 Aufnahme von Dosiswirkungskurven des GlyR Agonisten

Glyzin bei GlyR $\alpha 1$ -wt und GlyR $\alpha 1$ -gbm

Für die Erstellung von Dosiswirkungskurven und für die Messung von maximal induzierbaren Strömen (I_{max}), wurden aufsteigende Glyzinkonzentrationen appliziert. Zu Beginn jeder Messung wurde die Oozyte auf die Expression des GlyR durch

applizieren von 300 μ M-1mM überprüft und bei einer vorhandenen Rezeptorantwort verwendet. Die Applikationsreihe setzte sich aus folgenden Konzentrationen zusammen: 0,01mM; 0,03mM; 0,1mM; 0,3mM; 1mM; 3mM; 10mM; 30mM. Bei einer sich einstellenden Sättigung des Rezeptors wurde eine weitere Applikation höherer Konzentrationen nicht durchgeführt.

3.2.6.7 Auswertung der Dosiswirkungskurven des GlyR Agonisten

Glyzin bei GlyR α 1-wt und GlyR α 1-gbm

Die Auswertung der Messungen wurde mit dem Programm Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software, USA) durchgeführt. Um eine Dosiswirkungskurve zu erstellen mussten alle gemessenen Ströme auf den I_{max} normiert und gegen die logarithmischen Konzentrationswerte aufgetragen werden. Die Bestimmung der halbmaximalen Sättigung des Rezeptors (EC_{50} -Wert) durch den Agonisten und des Kooperativitätsfaktors n (Hill-Koeffizient) wurde durch die Anpassung der Dosiswirkungskurven anhand der Michaelis-Menten-Gleichung ermöglicht.

3.2.6.8 Statistische Analyse der Rezeptorantworten

Um die Daten der Messungen statistisch zu untersuchen und zu bewerten wurde das Programm Kaleidagraph 4.0 angewandt. Es wurde stets von einer Gauß'schen Normalverteilung der Daten ausgegangen und der Mittelwert und dazugehörige Standardfehler sowie die Standardabweichung bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde der ungepaarte students t-test als auch der one-way ANOVA-Test angewandt ($p < 0,01$ (*), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***)).

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Metabolische Markierung

Für die metabolische Markierung wurden 50nl (100µg/µl – 300µg/µl) in die Oozyten injiziert um sie anschließend über Nacht bei 19°C in einer [^{35}S] – Methionin haltigen (ca. 0,4MBq/Oozyte) ND96⁺ - Lösung zu inkubieren. Hierfür wurden zwischen 6 und 12 Oozyten pro Ansatz eingesetzt. Je nach gewünschter Expressionszeit (1-3 Tage) wurde die Markierung gestoppt und die Oozyten in einer nicht radioaktiven 10mM Methionin – Lösung gewaschen und in dieser Lösung für 1-3 Tage, je nach Experiment, weiter inkubiert.

3.3.2 Aufreinigung von 6-fach Histidin-markierten Proteinen aus *Xenopus laevis* Oozyten

Die 6-fach Histidin-markierten Proteine besitzen eine hohe Bindungsaffinität zu den Ni-NTA-Agarose-Beads, wodurch die spezifische Aufreinigung gewährleistet wird. Hierbei wird jeweils ein zweiwertiges Nickel-Ion von Nitrilotriessigsäure (NTA) als Chelat immobilisiert (Hochuli *et al.* 1989), wobei vier der sechs Liganden-Bindungsstellen von der Nitrilotriessigsäure besetzt werden. Die übrigen zwei Bindestellen dienen der Interaktion mit dem 6-fach Histidin-markierten Protein (Abb. 3.6).

Bei einem pH-Wert von 8,0 ist die His-Markierung nicht geladen und interferiert durch ihre geringe Größe nicht mit der Struktur und Funktion des aufgereinigten Proteins.

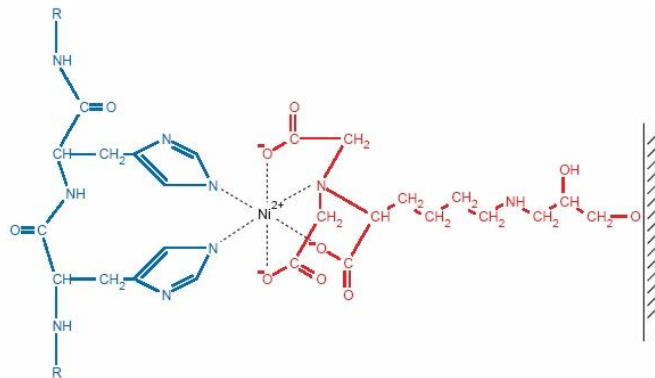


Abb. 3.6: Darstellung der Wechselwirkung des 2-fach positiv geladenen Nickelions mit der Nitrilotriessigsäure (rot), und mit den Histidin-Seitenketten (blau) des aufgereinigten Proteins.

Um die unspezifische Interaktion von nicht Histidin-markierten Proteinen mit den unbesetzten Stellen des Nickelions zu vermindern wurde dem Lyse- und Waschpuffer Imidazol in geringer Konzentration zugefügt. Die zu untersuchenden GlyR sind membranständige Proteine. Um die native Struktur des Rezeptors zu erhalten musste die Membran durch das Detergenz Dodecylmaltosid (0,5%) imitiert werden.

Protokoll der 6-fach Histidin vermittelten Proteinaufreinigung:

Die Oozyten wurden nach der Inkubation 4-5 mal mit Natriumphosphat-Puffer (0,1M) gewaschen. Anschließend wurde pro Oozyte 20µl Homogenisierungspuffer auf den Ansatz pipettiert und durch 20-25 maliges hoch und runterziehen die Oozyten homogenisiert und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Aus der Probe wurden 100µl nach einem Zentrifugationsschritt bei 4°C mit 15.000rpm für 10 Minuten, auf die vorbereiteten Ni-NTA-Agarose-Beads gegeben und für ½ Stunde in einen Kopf-über-Kopfdreher im Kühlraum bei 4°C gestellt.

Zusammenstellung des Bindungsansatzes:

- 100 µl Homogenat
- 400 µl Bindungspuffer
- 30 µl Ni-NTA-Agarosebeads
- 5 µl 1 M Imidazol pH 8.0

Daraufhin wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 13.200rpm bei 4°C für 1-2 Minuten der Überstand abgesaugt und die Ni-NTA-Agarose-Beads 4x mit je 1ml

Waschpuffer gewaschen. Zwischen den Waschritten wurde der Ansatz für 1-2 Minuten bei 13.200rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde 100µl Elutionspuffer auf die Ni-NTA-Agarose-Beads pipettiert und unter schütteln, bei 1050rpm für 8 Minuten, die Proteine eluiert.

3.3.3 Analyse des N-Glykosylierungsverhaltens von Proteinen

Zur Untersuchung der N-Glykosylierung der GlyR $\alpha 1$ Untereinheiten wurden die Proteinproben, vor der Gelelektrophorese, mit zwei unterschiedlich agierenden Enzymen behandelt. Die Glykosidase Endo- β -N-Acetylglucosamidase H (EndoH) spaltet die glykosidische Bindung zwischen zwei N-Acetylglykosamin-Molekülen von nicht-komplex glykosylierten Proteinen, während die Glykosidase Peptid-N4-(Acetyl- β -Glucosaminy)-Asparagin-Amidase (PNGaseF) Typen Asparagin gebundener N-Glycanketten von komplex-und nicht komplex glykolysierten Proteinen spaltet. Eine Resistenz des Proteins gegen die Deglykosylierung durch Endo H spricht für komplex glykosylierte Proteine und damit für das Golgi-spezifische anlagern von komplexen Zuckerketten an das Protein. Da die komplexe Glykosylierung von Proteinen einen der letzten Schritte der Proteinmodifikation darstellt, deutet es daraufhin, dass diese Proteine den sekretorischen Weg bestreiten, und zur Membranoberfläche transportiert werden. Um die Glykosidasen zu schützen wurde vor der SDS-PAGE dem Deglykosylierungspuffer Octylglykosid (10%) zugefügt.

Folgende Mengen wurden verwendet: 10 µl Proteinlösung

1x SDS-Probenpuffer

10 % Octylglucosid

+ 5 IUB milliunits EndoH oder PNGaseF Die Behandlung erfolgte für 1 h bei 37°C.

3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der einzelnen Proteinfractionen, entsprechend ihres molekularen Gewichts, erfolgte durch die diskontinuierliche SDS-PAGE. SDS (sodium-dodecyl-sulfate) ist ein negativ geladenes anionisches Detergenz, welches an Proteinen im gleichen Verhältnis bindet und somit die Eigenladung der Proteine überlagert, dadurch ist das Verhältnis von Ladung zu Größe für jedes Protein annähernd gleich. Eine weitere wichtige Eigenschaft des Detergenz ist die Zerstörung der tertiären Struktur der Proteine, wodurch die SDS-PAGE zu einem denaturierenden Verfahren wird. Um die Disulfidbrücken zu reduzieren und somit die Faltung von Proteinen aufzuheben wird den Proben noch DTT zugefügt. Polyacrylamidgele bestehen aus den Komponenten Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED und APS. Acrylamid wird während der Polymerisation zu Polyacrylamid verknüpft. Durch die Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer wie Methylenbisacrylamid wird ein klares durchsichtiges Gel erhalten, wobei Ammoniumperoxidsulfat-(NH₄)₂S₂O₈ (APS) bei dieser Reaktion als Katalysator fungiert und eine Radikalkettenreaktion startet. APS kann im Wasser freie Radikale (SO₄) bilden, welche mit Acrylamid eine Reaktion eingehen und das dabei gebildete Acrylamidradikal kann nun seinerseits mit einem Acrylamidmono- und polymer reagieren. TEMED (N, N, N, N'-Tetramethylethyldiamin) dient ebenfalls als Radikalkettenstarter und erleichtert die Radikalbildung von APS. Begünstigt wird das Polymerisieren des Gels durch Luftausschluss, da Sauerstoff zu einem Kettenabbruch führt, hierzu wurde das Gel mit Wasser überschichtet.

Die benötigten Mengen der einzelnen Komponenten für das SDS-Trenngel, SDS-Gradienten-Trenngel sowie für das SDS-Sammelgel sind folgend in tabellarischer Form dargestellt:

Tabelle.3.2: SDS-Trenngel (8 %) für Phase-Apparatur:

Lösung	eingesetztes Volumen
ddH ₂ O	4,96 ml
1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8.8	2,25 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	1,80 ml
TEMED	4,5 µl
APS 10%	45 µl

Das SDS-Trenngel wurde sofort nach zusammenpipettieren der Lösungen in die Gelkammer gegossen und mit Wasser überschichtet. Für ca. 1 Stunde folgte die Polymerisierung des Trenngels bei RT.

Um eine bessere Auftrennung der Banden zu gewährleisten wurde alternativ ein SDS-Gradienten-Trenngel gegossen. Ein linearer Acrylamid-Gradient wurde mittels eines Zweikammer-Gradientenmischers hergestellt.

Tabelle.3.3: SDS-Gradienten-Trenngel für Phase-Apparatur:

Lösung	eingesetztes Volumen (4%)	eingesetztes Volumen (10%)
ddH ₂ O	2,6 ml	0,5 ml
1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8.8	1 ml	1 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	0,4 ml	1 ml
40 % Saccharoselösung		1,5 ml
TEMED	23 µl	23 µl
APS 10%	2 µl	2 µl

Tabelle.3.4: SDS-Sammelgel 4 % für Phase-Apparatur:

Lösung	eingesetztes Volumen
ddH ₂ O	3,18 ml
1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8.8	1,26 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	0,50 ml
TEMED	5 µl
APS 10%	25 µl

Das Sammelgel wurde, nach abgießen des Wassers, auf das Trenngel gegossen und der benötigte Luftausschluss, für die Radikalkettenreaktion, wurde über das Einführen des Kamms erreicht. Die Polymerisierungsdauer betrug ca. 1 Stunde. Die Proteine wurden mit einer konstant angelegten Spannung von 100mV/2-3 Stunden aufgetrennt. Handelte es sich bei den aufzutrennenden Proteinen um radioaktiv-markierte, so wurde das Gel anschließend in einer Fixierlösung für 5 Minuten inkubiert und anschließend in einem Gel-Dryer unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Anschließend erfolgte eine einwöchige Lagerung des getrockneten Gels unter einem Kodak® BioMax MR Film bei -20°C. Über die radioaktive Strahlung der aufgereinigten Proteine, konnten nun spezifische Banden nach der Filmentwicklung detektiert werden.

3.4 Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM)

Verwendet wurde ein konfokales Umkehrmikroskop des Typs TCS-SP 2 der Firma Leica. Bei der konfokalen Mikroskopie wird ein im Präparat vorhandener Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laserimpuls einer spezifischen Wellenlänge angeregt, worauf dieser seinerseits Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Dieses emittierte Licht wird durch eine Blende im optischen System des Mikroskops (das sog. Pinhole) zurück auf ein Kameraelement geleitet. Dieses Pinhole lässt fast ausschließlich emittiertes Licht der Fokusebene des Anregungslasers durch. Dadurch kann man mit einem konfokalen Mikroskop optische Schnitte durch ein Präparat legen, die als Ergebnis ein Bild liefern, das neben einer guten Auflösung in den x- und y-Ebenen auch eine gute Auflösung in der z-Ebene besitzt. Angeregt wurde das Fluorochrom GFP durch einen Ar/Kr-Laser bei 488 nm. Die GFP – exprimierenden Oozyten wurden aufgenommen entweder unter Verwendung des 20x, 40x oder eines 63x Ölimmersionsobjektivs.

4. Ergebnisse

Um den Effekt von Gerüstproteinen auf die Funktion von inhibitorischen Rezeptoren zu untersuchen wurde an rekombinanten homopentameren GlyR $\alpha 1$ und heteropentameren GlyR $\alpha 1\beta$ Glyzin-Dosis-Wirkungskurven nach Ko-Expression mit Gephyrin und Collybistin SH3- in *Xenopus* Oozyten durchgeführt.

4.1 Gephyrin und Collybistin II SH3- verringern die apparente Glyzin-Affinität des heteropentameren GlyR $\alpha 1\beta$

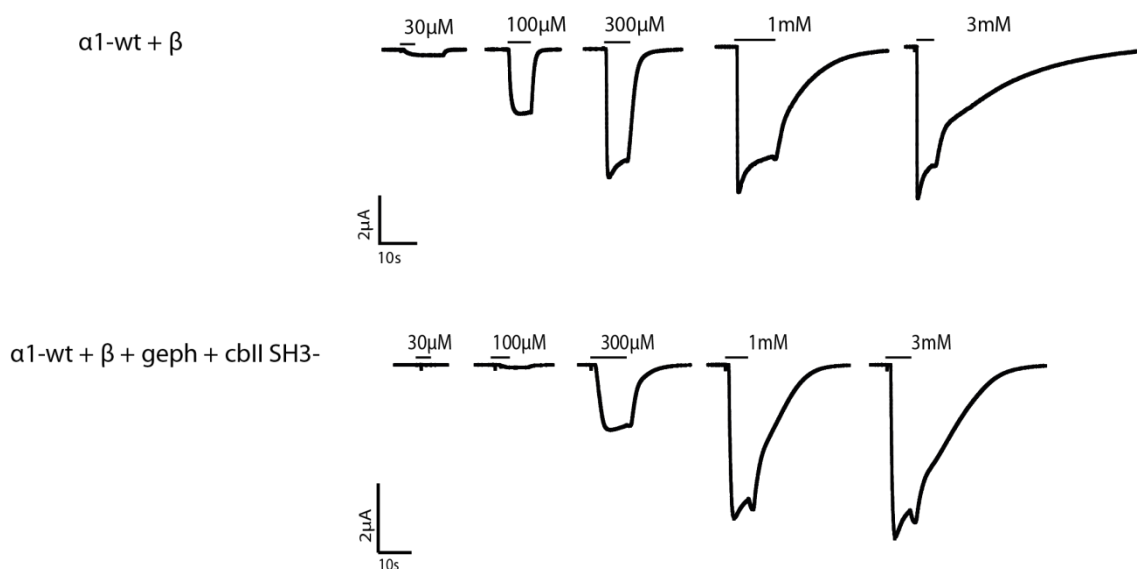


Abb.4.1: Glyzin induzierte Gesamtzellströme von GlyR $\alpha 1\text{-wt} + \beta$ und GlyR $\alpha 1\text{-wt} + \beta$ ko - exprimiert mit Gephyrin und Collybistin II SH3- bei aufsteigenden Glyzinkonzentrationen (30 μM - 3 mM) in *Xenopus laevis* Oozyten. In der oberen Abbildungshälfte sind die Stromkurven (Traces) von GlyR $\alpha 1\text{-wt} + \beta$ und in der unteren Abbildungshälfte die Traces von GlyR $\alpha 1\text{-wt} + \beta + \text{geph} + \text{cbII SH3-}$ abgebildet. Skalierung jeweils unten links.

Die aufgenommenen Einzelströme der Dosiswirkungskurven von GlyR $\alpha 1\text{-wt} + \beta$ und GlyR $\alpha 1\text{-wt} + \beta$ nach Ko - Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- zeigten einen unterschiedlichen Sättigungsverlauf (Abb. 4.1). Bei GlyR $\alpha 1\text{-wt} + \beta$ konnte die erste Rezeptorantwort bei einer Glyzinkonzentration von 30 μM detektiert werden, wohingegen die erste Rezeptorantwort von GlyR $\alpha 1\text{-wt} + \beta$ nach Ko - Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- erst bei einer Glyzinkonzentration von 100 μM gemessen wurde. Ebenfalls ersichtlich hierbei ist, dass die Sättigung des Rezeptors,

durch Ko – Expression mit den Gerüstproteinen, erst später einsetzte (1mM) im Vergleich zu GlyR $\alpha 1$ -wt + β ohne rekombinantes Gephyrin und Collybistin II SH3- (300 μ M).

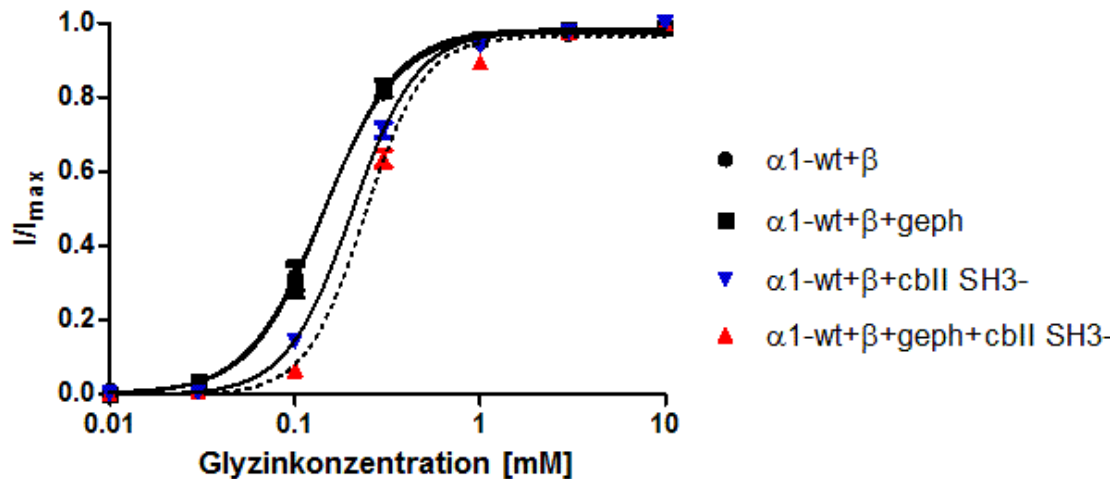


Abb. 4.2: Glyzin-Dosis-Wirkungskurven von GlyR $\alpha 1\beta$ nach Ko-Expression von Gephyrin und Gephyrin/Collybistin II SH3-. Die EC_{50} - Werte für die Dosis-Wirkungskurven gehen aus den gemittelten Werten für GlyR $\alpha 1\beta$ (●), $n=6$; GlyR $\alpha 1\beta$ /geph (■), $n=16$; GlyR $\alpha 1\beta$ /cbII SH3- (▼), $n=12$; GlyR $\alpha 1\beta$ /geph /cbII SH3- (▲), $n=11$ hervor. Für GlyR $\alpha 1\beta$ wurde ein EC_{50} – Wert von $149 \pm 9 \mu M$ ermittelt. Folgende EC_{50} – Werte für GlyR $\alpha 1\beta$ /geph $152 \pm 12 \mu M$, GlyR $\alpha 1\beta$ /cbII SH3 - $210 \pm 9 \mu M$ und für GlyR $\alpha 1\beta$ /geph /cbII SH3 - $255 \pm 9 \mu M$ konnten ermittelt werden.

Die Normierung der Stromantworten ergab, dass keine signifikante Erhöhung des EC_{50} – Wertes von GlyR $\alpha 1\beta$ ($149 \pm 9 \mu M$) zu GlyR $\alpha 1\beta$ /geph ($152 \pm 12 \mu M$) zu beobachten war (Abb. 4.2). Jedoch Collybistin II SH3- ko-exprimiert mit GlyR $\alpha 1\beta$ ($210 \pm 9 \mu M$ (**)) eine hochsignifikante Erhöhung des EC_{50} – Wertes aufzeigt. Wurden Gephyrin und Collybistin II SH3- mit GlyR $\alpha 1\beta$ Ko - exprimiert ($255 \pm 9 \mu M$ (***)) zeigte sich eine höchstsignifikante Erhöhung des EC_{50} – Wertes. Collybistin II SH3- ohne Ko-Expression mit Gephyrin verringert die apparente Glyzin – Affinität des heteropentameren GlyR $\alpha 1\beta$. Gephyrin ohne Ko-Expression mit Collybistin II SH3- zeigt keinen signifikanten Effekt auf den EC_{50} – Wert des GlyR $\alpha 1\beta$. Der EC_{50} – Wert von GlyR $\alpha 1\beta$ /cbII SH3- wurde durch die Expression von Gephyrin signifikant erniedrigt. Demnach scheint erst das Zusammenspiel bzw. die Anwesenheit beider Verankerungsproteine die beobachtete Erhöhung des EC_{50} – Wertes von GlyR $\alpha 1\beta$ /geph /cbII SH3- zu

ermöglichen. Die EC_{50} – Werte und die aus den Messungen hervorgegangenen maximal induzierbaren Ströme sind nachfolgend, für eine bessere Illustration, in einem Balkendiagramm zusammengefasst (Abb. 4.3)

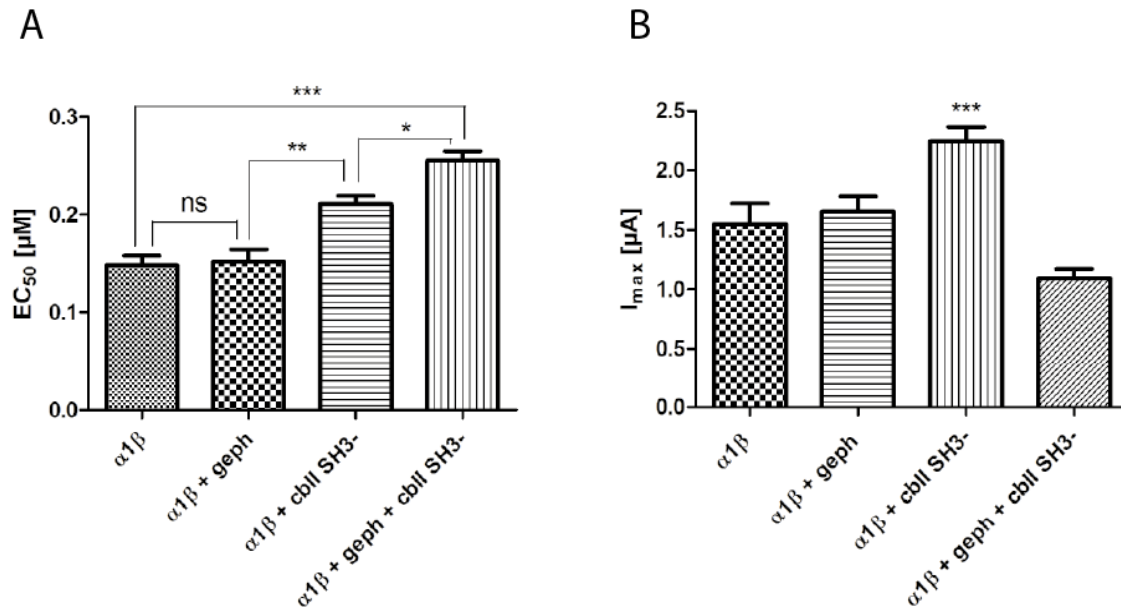


Abb. 4.3: EC_{50} – Werte von GlyR $\alpha 1\beta$ in Anwesenheit und Abwesenheit von Gephyrin und/oder Collybistin SH3- und die maximal induzierten Ströme (I_{max}). (A) Auftragung der gemittelten EC_{50} – Werte aus Abb.2. (B) Auftragung der maximal induzierbaren Ströme. Für GlyR $\alpha 1\beta$ ($1,55 \pm 0,17\mu A$), GlyR $\alpha 1\beta/\text{geph}$ ($1,66 \pm 0,12\mu A$), GlyR $\alpha 1\beta/\text{cbII SH3-}$ ($2,25 \pm 0,12\mu A$) und GlyR $\alpha 1\beta/\text{geph}/\text{cbII SH3-}$ ($1,1 \pm 0,08\mu A$). Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet. Auftretende Signifikanzen zwischen den einzelnen Messungen sind in (A) dargestellt. Bei den gemittelten maximal Strömen bezieht sich die Signifikanz auf den heteropentameren GlyR $\alpha 1\beta$. Signifikanzen wurden mit dem ANOVA – Test ($p < 0,05$) ermittelt.

Ein auffälliges Ergebnis bei den maximal Strömen war die hochsignifikante Zunahme des Stroms bei GlyR $\alpha 1\beta/\text{cbII SH3-}$ ($2,25 \pm 0,12\mu A$ (**)) im Vergleich zu GlyR $\alpha 1\beta$ ($1,55 \pm 0,17\mu A$). Und die tendenzielle Abnahme des Stroms bei GlyR $\alpha 1\beta/\text{geph}/\text{cbII SH3-}$ ($1,1 \pm 0,08\mu A$) verglichen mit GlyR $\alpha 1\beta$. Diese Zu- und Abnahme der maximalen Ströme korreliert nicht mit den EC_{50} – Werten wie aus Abb. 4.3 (A) und (B) zu entnehmen ist.

In dem oben aufgeführten Experiment könnte sich jedoch eine Problematik eingeschlichen haben. Die verwendete TEVC Messmethode ist in nur in der Lage „whole-cell“ Ableitungen durchzuführen. Daraus ergibt sich das Problem, dass eventuelle Mischpopulationen von heteropentameren GlyR $\alpha 1\beta$ und

homopentameren GlyR $\alpha 1$ -wt nicht voneinander unterschieden werden können und somit möglicherweise ein Mix aus beiden Populationen abgeleitet worden ist. Um dies zu umgehen wurde im nachfolgenden Kontrollexperiment ein GlyR $(\alpha 1\beta)_T$ - Konkatermer verwendet. Durch Ko-Expression des GlyR $(\alpha 1\beta)_T$ - Konkatermers mit der β - Untereinheit wurde sichergestellt, dass nur heteropentamere GlyR $\alpha 1\beta$ abgeleitet werden (Grudzinska et al., 2005).

Der EC_{50} - Wert von GlyR $(\alpha 1\beta)_T + \beta$ ($525 \pm 17 \mu M$) durch Ko-Expression mit Gephyrin ($502 \pm 29 \mu M$) wurde nicht erhöht (Abb. 4.4). Gleiches konnte im vorangegangenen Experiment mit GlyR $\alpha 1\beta$ beobachtet werden (siehe Abb. 4.3). Nach Ko-Expression des GlyR $(\alpha 1\beta)_T + \beta$ mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ($692 \pm 28 \mu M^{**}$) konnte eine hochsignifikante Erhöhung des EC_{50} - Wertes beobachtet werden. Dieses Ergebnis spiegelt ebenfalls die Beobachtungen aus dem GlyR $\alpha 1\beta$ Experiment wider. Die dazugehörigen gemittelten maximalen Ströme zeigten keine signifikanten Abweichungen. Dies war auch nicht unbedingt zu erwarten, da es sich in diesem Experiment um eine gepaarte Analyse handelte. An Tag (1) wurde GlyR $(\alpha 1\beta)_T$ und die β - Untereinheit in die Oozyte injiziert. An Tag (2) wurde GlyR $(\alpha 1\beta)_T + \beta$ gemessen und in die gemessenen Oozyten anschließend Gephyrin injiziert. Diese sukzessive Injektion wurde an Tag (3) noch mit Collybistin II SH3- fortgesetzt. Es war jedoch äußerst schwierig messbare Ströme mit dem Konstrukt GlyR $(\alpha 1\beta)_T + \beta$ zu generieren. Wie in Abb.4.4 (B) zu erkennen lagen die maximalen Ströme von GlyR $(\alpha 1\beta)_T + \beta$ (650 ± 125 nA), $(\alpha 1\beta)_T + \beta$ /geph (737 ± 90 nA) und $(\alpha 1\beta)_T + \beta$ /geph/cbII SH3- (553 ± 79 nA) deutlich unter $1 \mu A$. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente auf das GlyR $\alpha 1$ -gbm Konstrukt zurückgegriffen. Dadurch sollten die Probleme der geringen Ströme (GlyR $(\alpha 1\beta)_T + \beta$, Konkatermer) sowie der Mischpopulationen (GlyR $\alpha 1\beta$, GlyR $\alpha 1$ -wt) eliminiert werden.

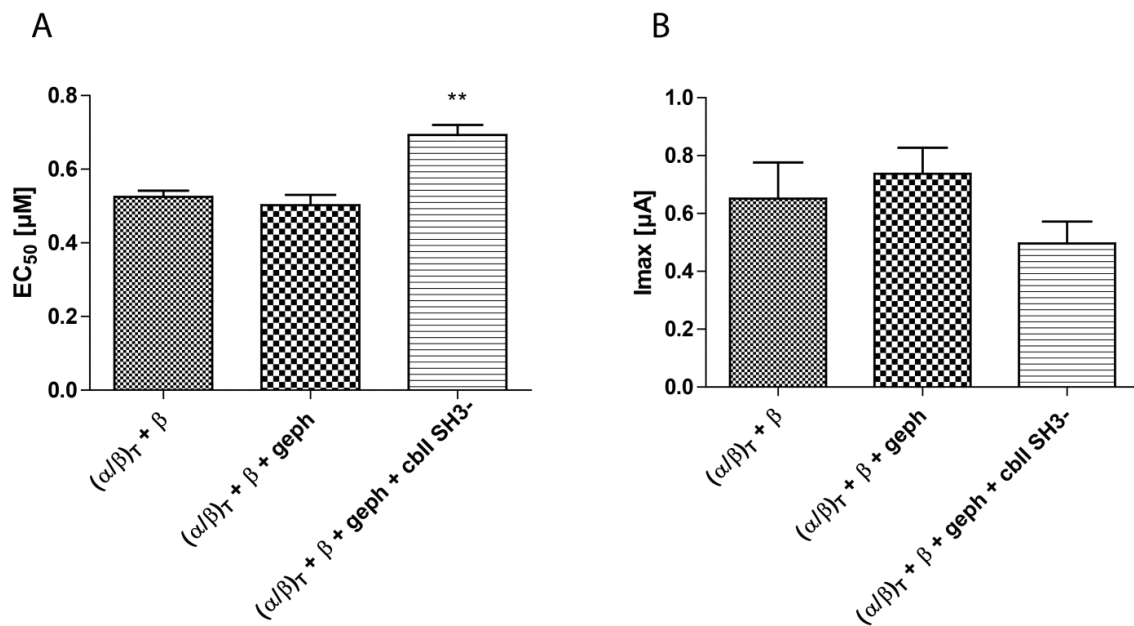


Abb. 4.4: Dargestellt sind die EC₅₀ – Werte von GlyR (α1β)_T+ β) nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- und die maximal induzierten Ströme. (A) Folgende EC₅₀ – Werte konnten ermittelt werden. GlyR (α1β)_T + β (525 ± 17 μM), n=9; GlyR (α1β)_T + β/geph (502 ± 29 μM), n=9 und für GlyR (α1β)_T + β/geph/cbII SH3- (692 ± 28 μM), n=9. Die Signifikanzen bei der EC₅₀ – Wert Darstellung beziehen sich auf (α1β)_T + β und wurden mittels gepaarten t – test untersucht. Für die maximalen Ströme wurden folgende Werte ermittelt. (α1β)_T + β (650 ± 125 μA), n=9; (α1β)_T + β/geph (737 ± 90 μA), n=9 und (α1β)_T + β/geph/cbII SH3- (553 ± 79 μA), n=9. Es konnten keinerlei Signifikanzen mittels gepaarten t - test festgestellt werden. Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet.

Fazit: Es konnte in den oben aufgeführten Experimenten gezeigt werden, dass Gephyrin sowohl nach Ko-Expression mit GlyR (α1β)_T + β als auch mit GlyR α1β keine signifikante Erhöhung des EC₅₀ – Wertes bewirkt. Die Ko-Expression von Collybistin II SH3- zusammen mit Gephyrin und GlyR (α1β)_T + β oder GlyR α1β zeigte jeweils eine signifikante Erhöhung des EC₅₀ – Wertes.

4.2 Homopentamere GlyR α1-gbm zeigen im Gegensatz zu GlyR α1-wt nach Ko-Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- eine Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität

Um die niedrigen Ströme von (α1β)_T + β und die Mischpopulationen von α1β nach der Expression in *Xenopus laevis* Oozyten zu umgehen wurde im nachfolgendem Experiment ein GlyR α1 – Konstrukt verwendet, in welches das Gephyrinbindemotiv

der β – Untereinheit in die zytoplasmatischen Schleife kloniert wurde (GlyR α 1-gbm). Die Einbringung des Gephyrin-Bindemotivs in die cytoplasmatische Schleife zwischen die TM3-TM4 des GlyR α 1 – wt (GlyR α 1-gbm) zeigt keine signifikante Änderung der apparenten Glyzin - Affinität ($97 \pm 6\mu\text{M}(\text{ns})$) im Vergleich zu GlyR α 1 – wt ($132 \pm 14\mu\text{M}$). Nach Ko – Expression von GlyR α 1-gbm mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ($1142 \pm 190 \mu\text{M}(\text{***})$) zeigte sich eine höchstsignifikante Verschiebung zu höheren EC_{50} – Werten (s. Abb. 4.5).

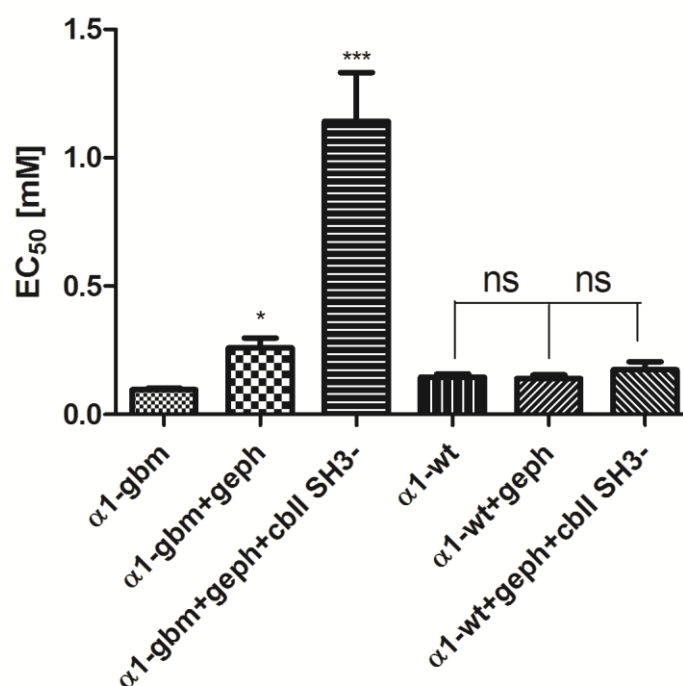


Abb. 4.5: Dargestellt sind die EC_{50} – Werte von GlyR α 1-gbm und GlyR α 1-wt in Anwesenheit und Abwesenheit von Gephyrin und Collybistin II SH3-. Folgende EC_{50} – Werte konnten ermittelt werden. Für GlyR α 1-gbm ($96 \pm 6\mu\text{M}$), $n=17$; GlyR α 1-gbm/geph ($260 \pm 39\mu\text{M}$), $n=9$; GlyR α 1-gbm/geph/cbII SH3- ($1142 \pm 190\mu\text{M}$), $n=5$; GlyR α 1-wt ($132 \pm 14\mu\text{M}$), $n=7$; GlyR α 1-wt/geph ($141 \pm 14\mu\text{M}$), $n=16$ und GlyR α 1-wt/geph/cbII SH3- ($175 \pm 30\mu\text{M}$), $n=6$. Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet. Die Signifikanzen bei der EC_{50} – Wert - Darstellung beziehen sich auf α 1-gbm bzw. sind gesondert ausgewiesen und wurden mittels ANOVA ($p<0,05$) ermittelt.

Im Gegensatz zur Ko-Expression von GlyR α 1 β mit Gephyrin (siehe Abb. 4.3) zeigt die Ko – Expression von GlyR α 1-gbm mit Gephyrin ($260 \pm 39\mu\text{M}(\text{*})$) eine signifikante Verringerung der apparenten Affinität. Als Kontrolle wurden bei diesem Experiment GlyR α 1 – wt mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ko – exprimiert. Sowohl GlyR α 1 – wt mit Gephyrin ($141 \pm 14\mu\text{M}(\text{ns})$) als auch GlyR α 1 – wt mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ($175 \pm 30(\text{ns})$) zeigten keine signifikante Änderung im EC_{50} – Wert. Die

Anwesenheit des Gephyrin – Bindemotivs im GlyR $\alpha 1$ -gbm ist demzufolge notwendig um die Affinitätsverschiebung durch Gephyrin und Collybistin II SH3- zu bewirken. Das Einbringen des Gephyrin – Bindemotivs in GlyR $\alpha 1$ -wt hat, den Ergebnissen zur Folge, weder Einfluss auf die apparente Glyzin – Affinität noch auf den maximal induzierbaren Strom (Tab. 4.1). Folglich wurden die weiteren Experimente mit GlyR $\alpha 1$ -gbm durchgeführt. Die in Tab. 4.1 dargestellten maximalen Ströme der einzelnen Konstrukte zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 4.1. Auflistung der gemittelten EC_{50} – und I_{max} - Werte von GlyR $\alpha 1$ -gbm und GlyR $\alpha 1$ -wt nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-. Eingetragene Signifikanzen beziehen sich auf GlyR $\alpha 1$ -gbm bzw. GlyR $\alpha 1$ -wt. Es waren keine signifikanten Unterschiede bei den maximal induzierten Strömen zu verzeichnen.

Konstrukt	Anzahl (n)	EC_{50} [μM]	I_{max} [μA]
GlyR $\alpha 1$ -gbm	18	97 ± 6	$5,63 \pm 0,52$
GlyR $\alpha 1$ -gbm+geph	9	260 ± 39 (*)	$6,44 \pm 1,03$
GlyR $\alpha 1$ -gbm+geph+cbII SH3-	12	1142 ± 190 (***)	$5,44 \pm 0,73$
GlyR $\alpha 1$ -wt	7	145 ± 13	$5,16 \pm 0,58$
GlyR $\alpha 1$ -wt+geph	17	141 ± 14	$7,06 \pm 0,96$
GlyR $\alpha 1$ -wt+geph+cbII SH3-	6	175 ± 30	$5,27 \pm 0,51$

Fazit: Die Insertion des Gephyrinbindemotivs in die GlyR $\alpha 1$ -wt Untereinheit bewirkt wie bei heteropentameren GlyRs nach Ko-Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- eine Erniedrigung der apparenten Affinität. Das Gephyrinbindemotiv ist für die Erniedrigung der apparenten Glyzin - Affinität verantwortlich und nicht die β – Untereinheit.

4.3 Untersuchung des Einflusses von Gephyrin und Collybistin II SH3- auf die Translokation des GlyR mittels CLSM

Die konfokale Laserrastermikroskopie (engl. CLSM) sollte in weiteren Versuchen genutzt werden um neue Erkenntnisse über die Verteilung des GlyR in der Oozytenmembran nach Wechselwirkung mit Gephyrin und Collybistin II SH3- zu gewinnen. Um die Untersuchung zu gewährleisten wurden GFP – markierte GlyR $\alpha 1$ -

gbm Konstrukte verwendet. Das GFP wurde hierbei am extrazellulären C-Terminus eingebracht. Weiterhin wurden ebenfalls C-Terminal GFP – markierte Gephyrin und Collybistin II SH3- Konstrukte verwendet. Nach Injektion der jeweiligen Konstrukt cRNA in die Oozyte wurde mindestens 2 Tage exprimiert.

4.4 Das Anhängen von GFP an den C-Terminus des GlyR $\alpha 1$ -gbm beeinflusst nicht die durch Gephyrin und Collybistin II SH3- hervorgerufene apparente Glyzin – Affinitätsverringering

Um Experimente mit dem Konstrukt GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP am CLSM durchführen zu können, sollte zuerst sichergestellt werden, dass es zu keiner Beeinflussung der Rezeptorfunktionalität durch das C-Terminal angehängte GFP kommen kann. Um dies zu untersuchen wurde GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP zusammen mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ko – exprimiert und mittels TEVC abgeleitet. Es zeigte sich, dass GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP ($149 \pm 14 \mu\text{M}$) keinen signifikant unterschiedlichen EC_{50} – Wert im Vergleich zu GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP/geph ($190 \pm 20 \mu\text{M}$ (ns)) aufweist (Abb. 4.6).

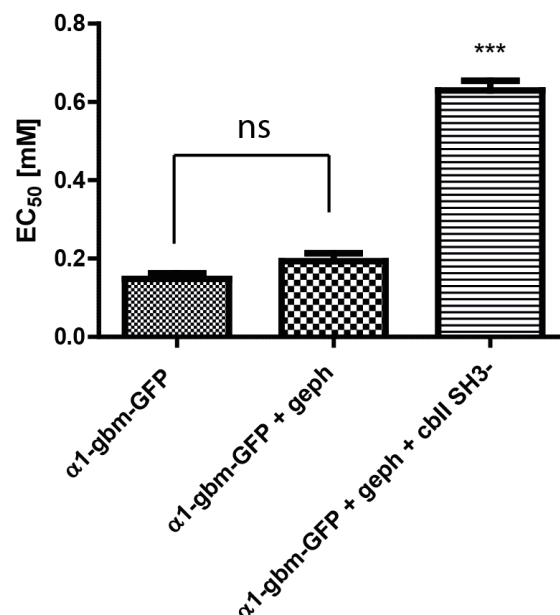


Abb. 4.6: Auswirkungen des C-Terminal gelegenen GFP von GlyR $\alpha 1$ -gbm auf die apparente Glyzin – Affinität nach Ko - Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede von GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP ($149 \pm 14 \mu\text{M}$, n=4) im Vergleich zu GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP/geph ($190 \pm 20 \mu\text{M}$, n=4). Eine höchstsignifikante Erhöhung des EC_{50} – Wertes ist von GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP und GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP/geph zu und GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP/geph/cbII SH3- ($630 \pm 25 \mu\text{M}$, n=4) zu beobachten.

Eine höchstsignifikante Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität war jedoch im Vergleich von GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP und GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP/geph zu GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP/geph/cbII SH3- ($630 \pm 25 \mu\text{M}^{***}$) zu beobachten. Das Experiment zeigte, dass GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP im gleichen Maße eine Glyzin – Affinitätsverringern durch Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin erfährt wie dies bei GlyR $\alpha 1$ -gbm zu beobachten war. Auch die EC_{50} – Werte wichen nicht stark voneinander ab (vergleiche mit Kap. 4.2).

4.5 Collybistin II SH3- bestimmt die Translokation von GlyR $\alpha 1$ -gbm und Gephyrin

Nach Analyse der CLSM – Aufnahmen lässt sich festhalten, das GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP Cluster (Abb. 4.7 (A)) in der Oozytenmembran eine diffuse Verteilung aufwiesen. Nach Ko – Expression von GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP mit Gephyrin (B) war keine erkennbare Umverteilung der GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP Cluster zu beobachten. Auffallend hierbei war, dass Collybistin II SH3-, nach Ko – Expression mit Gephyrin, GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP (C) in wabenförmige Strukturen translokieren konnte.

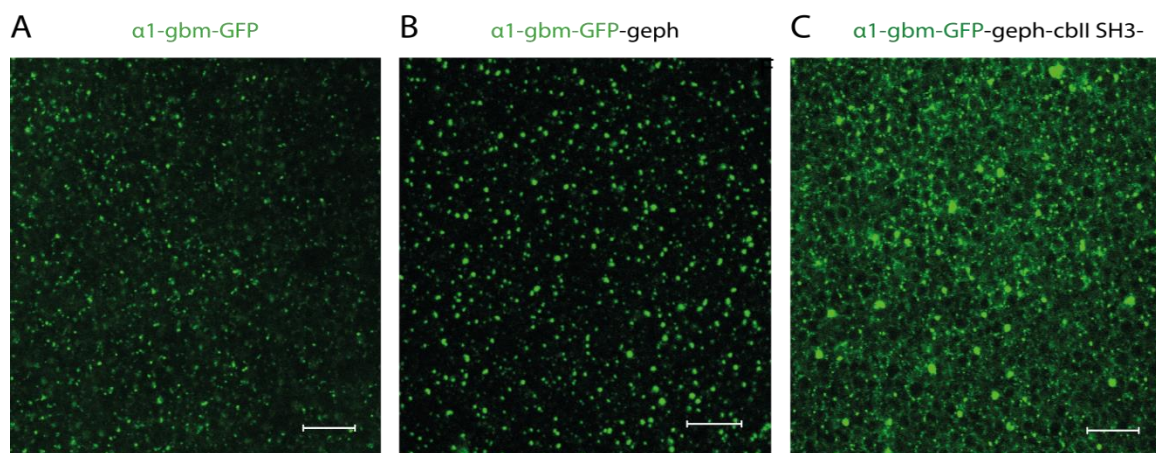


Abb. 4.7: CLSM – Aufnahmen von GFP – markierten GlyR $\alpha 1$ -gbm mit/ohne Ko – Expression von Gephyrin Und Collybistin II SH3-. Verwendet wurde ein 63x Objektiv. Eventuelle Ko – Expressionen sind mit angegeben. (A) GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP, diffuse Verteilung der Rezeptor – Anhäufungen. (B) GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP-geph, diffuse Verteilung der Rezeptor – Anhäufungen nach Ko – Expression mit Gephyrin. (C) GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP-geph-cbII SH3-, geordnete Strukturen von GlyR $\alpha 1$ -gbm mit wabenförmigen Charakter nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-. Skalierung beträgt $10 \mu\text{m}$.

Bei den nächsten Experimenten sollte Gephyrin-GFP untersucht werden und mit Collybistin II SH3- und/oder GlyR $\alpha 1$ -gbm ko – exprimiert werden. GlyR $\alpha 1$ -gbm war nicht in der Lage Gephyrin-GFP Anhäufungen (Abb. 4.8 (D) in erkennbare Strukturen zu ordnen. Es zeigte sich außerdem dass Gephyrin-GFP ohne Ko-Expression (E) mit GlyR $\alpha 1$ -gbm oder Collybistin II SH3- nicht zur Oozytenmembran transportiert wird. Außerdem war Collybistin II SH3- in der Lage Gephyrin-GFP nach Ko-Expression mit GlyR $\alpha 1$ -gbm (F + G) in wabenförmige Strukturen zu ordnen.

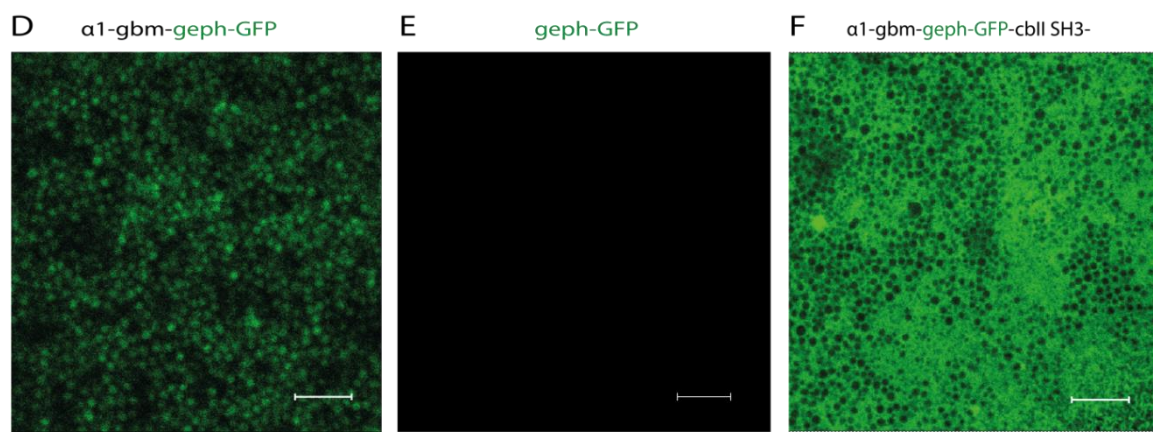


Abb. 4.8: CLSM – Aufnahmen von GFP – markierten Gephyrin mit/ohne Ko – Expression von GlyR $\alpha 1$ -gbm und Collybistin II SH3-. Verwendet wurde ein 63x Objektiv. Eventuelle Ko – Expressionen sind mit angegeben. (D) GlyR $\alpha 1$ -gbm-geph-GFP, ungeordnete Gephyrin – Cluster nach Ko – Expression mit GlyR $\alpha 1$ -gbm. (E) Geph-GFP, keine Gephyrin - Clusterbildung nahe der Oozytenmembran ohne Ko-Expression mit GlyR $\alpha 1$ -gbm und Collybistin II SH3-. (F) GlyR $\alpha 1$ -gbm-geph-GFP-cbII SH3-, geordnete Strukturen von Gephyrin nach Ko – Expression mit GlyR $\alpha 1$ -gbm/cbII SH3- mit wabenförmigen Charakter. Skalierung beträgt 10 μ m, Ausnahme bei (D) 5 μ m.

Nach alleiniger Expression von GFP – markierten Collybistin II SH3- (H) und Detektion der Anreicherungen wurden ebenfalls die wabenförmigen Anordnungen beobachtet. Zur besseren Illustration sind in Abb. 4.8 (G+H+I) nochmals die Experimente zusammengefasst, welche die Collybistin II SH3- abhängige wabenförmige Strukturenbildung zeigten.

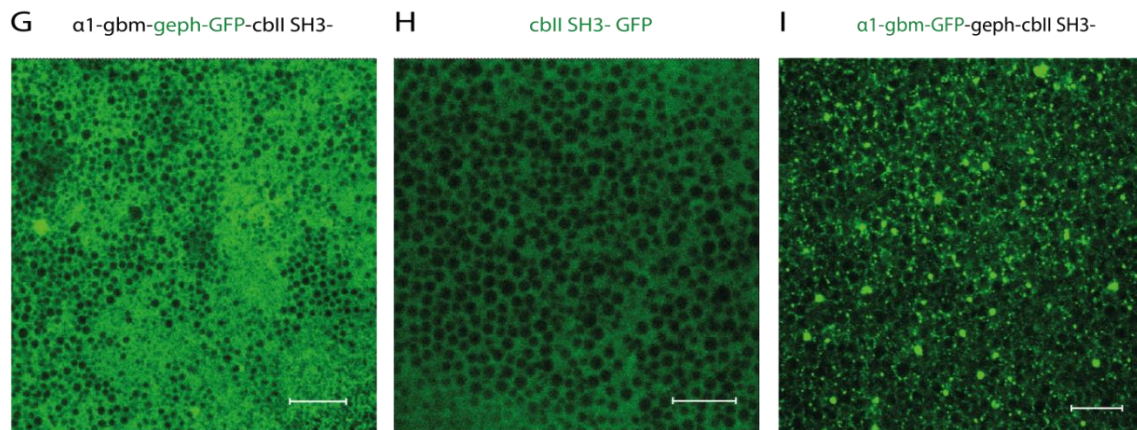


Abb. 4.8: CLSM – Aufnahmen von GFP – markierten GlyR α 1-gbm, Gephyrin und CollybistinII SH3-. Verwendet wurde ein 63x Objektiv. Eventuelle Ko – Expressionen sind mit angegeben. Zur besseren Illustration wurden die Abbildungen mit Collybistin II SH3- abhängiger Bildung von Wabenstrukturen zusammengefasst. (G) entspricht (F) aus Abb. 4.8; GlyR α 1-gbm-geph-GFP-cbII SH3-, geordnete Strukturen von Gephyrin nach Ko – Expression mit GlyR α 1-gbm/cbII SH3- mit wabenförmigen Charakter. (H) cbII SH3- GFP, geordnete Strukturen von Collybistin II SH3- mit wabenförmigen Charakter. (I) entspricht (C) aus Abb. 4.7; GlyR α 1-gbm-GFP-geph-cbII SH3-, geordnete Strukturen von GlyR α 1-gbm mit wabenförmigen Charakter nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-. Skalierung beträgt 10 μ m.

Fazit: Aus den CLSM – Aufnahmen wird ersichtlich, dass Gephyrin nicht die Fähigkeit besitzt GlyR α 1-gbm-GFP Anreicherungen umzustrukturieren, da Gephyrin-GFP selbst nur diffus in der Oozytenmembran verteilt ist. Nur Collybistin II SH3- GFP scheint sich geordnet, in wabenform - ähnlicher Struktur, an der Oozytenmembran anzureichern. Gephyrin-GFP und GlyR α 1-gbm-GFP werden ebenfalls durch die Anwesenheit von Collybistin II SH3- in diese Strukturen gedrängt. Collybistin II SH3- scheint über die Translokierung von Gephyrin-GFP und GlyR α 1-gbm-GFP eine gewisse Dominanz zu besitzen. Es ist außerdem vorstellbar, dass die in Abb. 4.8 durch Collybistin II SH3- hervorgerufene Umverteilung der GlyR α 1-gbm-GFP und Gephyrin-GFP Anreicherungen mit der durch TEVC ermittelten Collybistin II SH3- mediierten Verringerung der apparenten – Liganden Affinität korreliert.

4.6 Collybistin II SH3- bewirkt eine Zunahme der GlyR α 1-gbm-GFP Clustergröße nach Ko – Expression mit Gephyrin

Nicht nur die Verteilung der GlyR α 1-gbm-GFP Anreicherungen änderte sich durch die Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-. Ebenfalls wurde eine höchstsignifikante Zunahme der GlyR α 1-gbm-GFP Clustergröße ($1,33 \pm 0,04\mu\text{m}$) durch die Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ($1,85 \pm 0,11\mu\text{m}^{***}$) festgestellt (Abb. 4.9). Gephyrin ($1,33 \pm 0,05\mu\text{m}(\text{ns})$) konnte diese Zunahme der GlyR α 1-gbm-GFP Clustergröße nicht bewirken. Zudem wurden die Clustergrößen von GlyR α 1-gbm-GFP/geph nach Ko – Expression mit Collybistin II SH3- auch höchstsignifikant erhöht.

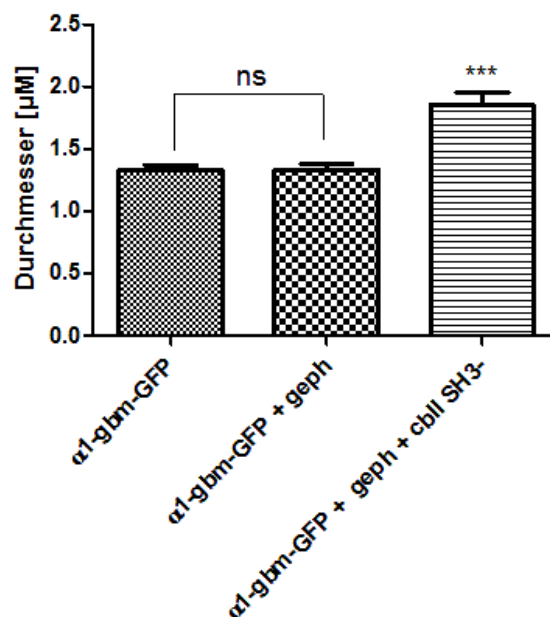


Abb. 4.9: Auswertung zufällig ausgewählter GlyR α 1-gbm-GFP Cluster mit und ohne Ko – Expression mit Gephyrin und CollybistinII SH3-. Folgende gemittelte Clustergrößen konnten ermittelt werden. Für GlyR α 1-gbm-GFP ($1,33 \pm 0,04\mu\text{m}$), $n=54$; GlyR α 1-gbm-GFP/geph ($1,33 \pm 0,05\mu\text{m}$), $n=37$ und GlyR α 1-gbm-GFP/geph/cbII SH3- ($1,85 \pm 0,11\mu\text{m}$), $n=31$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Signifikanzen wurden mit dem ANOVA – Test ($p<0,05$) ermittelt.

4.7 Die Wechselwirkung des inhibitorischen GABA_ARs mit Gephyrin und Collybistin II SH3- führt wie bei GlyR $\alpha 1$ -gbm zu einer Verringerung der apparenten Liganden – Affinität

Durch die vorangegangenen Ergebnisse konnte ermittelt werden, dass Gephyrin und Collybistin sowohl die apparente Glyzin – Affinität am heteropentameren GlyR $\alpha 1\beta$ als auch am homopentameren GlyR $\alpha 1$ -gbm verringert. Es stellte sich die Frage, ob die Wechselwirkung von Gephyrin und Collybistin auch andere Rezeptoren in ihrer Funktionalität beeinflussen kann. Als erster Kandidat für diese These kamen die GABA_ARs in Betracht, denn die GABA_ARs sind wie der GlyR hauptsächlich inhibitorische Liganden - gesteuerte Ionenkanäle und in der Lage mit Gephyrin und sogar mit Collybistin direkt zu interagieren. Die GABA_ARs können jedoch aus einer Vielzahl mehr an Untereinheitenkombinationen generiert werden als der GlyR, wobei die $\alpha 1$ - $\alpha 3$ und $\beta 2$, $\beta 3$ nachweislich mit Gephyrin interagieren und die $\alpha 2$ mit Collybistin wechselwirkt. Es wurde sich aus diesem Grund vorab auf einige GABA_AR Kombinationen beschränkt. Und es sollte herausgefiltert werden, ob diese Wechselwirkungen ebenfalls zu einer Verringerung der apparenten GABA – Affinität führt.

4.8 Gephyrin und Collybistin II SH3- verringern die apparente GABA – Affinität bei GABA_AR $\alpha 1\beta 3$

Wie in Abb. 4.10 (A) zu sehen lag die GABA abhängige Dosiswirkungskurve von GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ (•) auf dem Niveau von GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ /geph(■). Die Dosiswirkungskurve von GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ /cbII SH3- (▲) zeigte eine leichte Rechtsverschiebung im Vergleich zu GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ /geph zu höheren GABA – Konzentrationen. Eine weitere Verschiebung zu höheren GABA – Konzentrationen zeigte die Dosiswirkungskurve von GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ /geph/cbII SH3- (▼) im Vergleich zu GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ /cbII SH3- bzw. GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ /geph. Dies spiegelt sich auch in den ermittelten EC₅₀ – Werten (Abb. 4.10 (B)) wider. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ ($3,54 \pm 0,27\mu\text{M}$) und GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ /geph ($3,47 \pm 0,3\mu\text{M}(\text{ns})$) festgestellt. Ebenfalls nicht signifikant

unterschiedlich waren die EC_{50} – Werte von $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /geph und $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /cbII SH3- ($4,56 \pm 0,28\mu M$ (ns)).

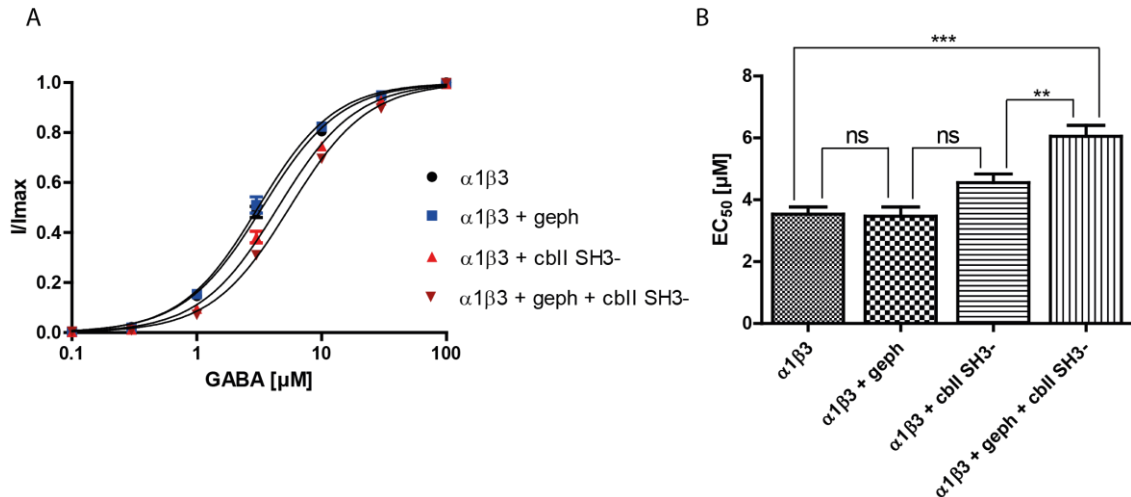


Abb. 4.10: Dargestellt sind GABA abhängige Dosis – Wirkungskurven und deren EC_{50} - Werte am $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-. (A) Die Werte der Dosis-Wirkungskurven gehen aus den gemittelten Werten für $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ (•), $n=26$; $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /geph (■), $n=27$; $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /cbII SH3- (▲), $n=26$ und $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /geph/cbII SH3- (▼), $n=29$ hervor. (B) Es konnten folgende EC_{50} – Werte ermittelt werden. Für $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ ($3,54 \pm 0,27\mu M$), $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /geph ($3,47 \pm 0,3\mu M$); $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /cbII SH3- ($4,56 \pm 0,28\mu M$) und für $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /geph/cbII SH3- ($6,06 \pm 0,35\mu M$). Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet. Auf Signifikanzen wurde mit dem ANOVA – Test ($p < 0,05$) geprüft.

Ein höchstsignifikanter Unterschied wurde zwischen $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ und $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /geph/cbII SH3- ($6,06 \pm 0,35\mu M$ (***) beobachtet. Weiterhin ist der Unterschied im gemittelten EC_{50} – Wert von $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /cbII SH3- und $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ /geph/cbII SH3- hochsignifikant.

4.9 Collybistin II SH3- verringert die apparente GABA – Affinität bei $GABA_A$ R $\alpha 2\beta 3$ auch ohne Gephyrin

Die nächste untersuchte Untereinheiten - Komposition $GABA_A$ R $\alpha 2\beta 3$ ($8,61 \pm 0,76\mu M$) (siehe Abb. 4.11) zeigte nach Ko – Expression mit Gephyrin ($6,87 \pm 0,46\mu M$ (ns)) keinen signifikanten Unterschied im EC_{50} – Wert, wie auch schon bei $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ festzustellen war. Ebenfalls höchstsignifikant, wie bei $GABA_A$ R $\alpha 1\beta 3$ ebenfalls zu beobachten war, ist der Unterschied zwischen $GABA_A$ R $\alpha 2\beta 3$ und $GABA_A$ R $\alpha 2\beta 3$ /geph/cbII SH3- ($13,51 \pm 0,92\mu M$ (***)). Interessanterweise zeigte sich jedoch ein

höchstsignifikanter Unterschied zwischen GABA_AR α1β3/geph und GABA_AR α2β3/cbII SH3- ($14,38 \pm 0,65 \mu\text{M} (***)$).

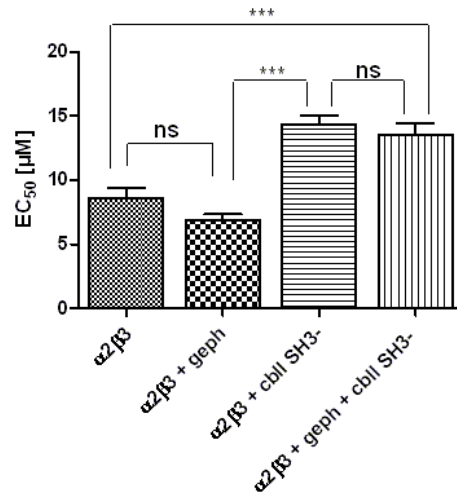


Abb. 4.11: Dargestellt sind die EC₅₀ – Werte von GABA_AR α2β3 nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-. Es konnten folgende EC₅₀ – Werte ermittelt werden. Für GABA_AR α2β3 ($8,61 \pm 0,76 \mu\text{M}$), n=15; GABA_AR α2β3/geph ($6,87 \pm 0,46 \mu\text{M}$), n=11; GABA_AR α2β3/cbII SH3- ($14,38 \pm 0,65 \mu\text{M}$), n=10 und für GABA_AR α2β3/geph/cbII SH3- ($13,51 \pm 0,92 \mu\text{M}$), n=9. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Signifikanzen wurden mit dem ANOVA – Test ($p < 0,05$) ermittelt.

Ebenfalls bemerkenswert war die Beobachtung, dass GABA_AR α2β3/geph/cbII SH3- im Vergleich zu GABA_AR α2β3/cbII SH3- nicht signifikant unterschiedlich ist. Alleine Collybistin II SH3- ermöglicht, den Ergebnissen zu Folge, die apparente GABA – Affinität des GABA_AR α2β3 auf das Niveau von GABA_AR α2β3 nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- zu verringern.

Tab.4.2: Zusammenfassung der gemittelten EC₅₀– Werte und der maximal induzierbaren Ströme von GABA_AR α1β3 und GABA_AR α2β3 mit oder ohne Ko – Expression von Gephyrin und/oder Collybistin II SH3-. Die eingetragenen Signifikanzen beziehen jeweils auf eine GABA_AR – Zusammensetzung und wurden mittels one-way ANOVA – Test ($p < 0,05$) ermittelt

Konstrukte	Stichproben (n)	EC ₅₀ [μM]	I _{max} [μA]
α1β3	26	$3,54 \pm 0,27$	$3,18 \pm 0,28$
α1β3/geph	27	$3,47 \pm 0,3$	$3,92 \pm 0,37$
α1β3/cbII SH3-	26	$4,56 \pm 0,28$	$1,77 \pm 0,24$
α1β3/geph/cbII SH3-	29	$6,06 \pm 0,35 (***)$	$2,11 \pm 0,19 (*)$
Konstrukte	Stichproben (n)	EC ₅₀ [μM]	I _{max} [μA]
α2β3	15	$8,61 \pm 0,76$	$4,42 \pm 0,43$
α2β3/geph	11	$6,87 \pm 0,46$	$5,14 \pm 0,31$
α2β3/cbII SH3-	10	$14,38 \pm 0,65 (***)$	$1,28 \pm 0,27 (***)$
α2β3/geph/cbII SH3-	9	$13,51 \pm 0,92 (***)$	$2,61 \pm 0,81 (*)$

Fazit: Es bleibt festzuhalten, dass bei jeder GABA_AR – Komposition nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- eine Verringerung der apparenten GABA – Affinität beobachtet werden konnte (s. Tab. 4.2).

4.10 Gephyrin und Collybistin II SH3- verringern nicht die apparente GABA – Affinität von GABA_ARs nach Ko – Expression der γ - Untereinheit

Die meisten synaptisch lokalisierten GABA_ARs besitzen eine γ – Untereinheit. Um herauszufinden welchen Einfluss die γ – Untereinheit auf die Funktionalität des GABA_AR besitzt wurde diese mit GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ und GABA_AR $\alpha 2\beta 3$ ko – exprimiert. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwiefern die apparente GABA – Affinitäts Verringerung, bei Anwesenheit der γ – Untereinheit, durch Gephyrin und Collybistin II SH3- zu beobachten ist. Da GABA_AR α - und β – Untereinheiten funktionelle Rezeptoren ausbilden können musste noch der Einbau der γ – Untereinheit sichergestellt werden. Hierzu wurde Diazepam aus der Gruppe der Benzodiazepine verwendet. Diazepam besitzt eine Bindestelle zwischen der α – und γ – Untereinheit und besitzt die Fähigkeit die Stromantwort von GABA_ARs zu potenzieren (Abb. 4.12). Nach der Aufnahme von Dosis-Wirkungskurven mit dem entsprechenden GABA_AR wurde eine GABA-Konzentration appliziert die dem EC₂₀ des Rezeptors entsprach. Anschließend wurden 350 μ l 10 μ M Diazepam (Dz) appliziert und nach 30s erneut mit der entsprechenden Konzentration GABA aktiviert.

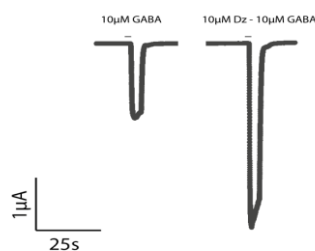


Abb. 4.12: Dargestellt sind Beispieltraces von GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ s nach Applikation von 10µM GABA vor der Inkubation mit 10µM Diazepam (links) und nach Inkubation von 10µM Diazepam (rechts).

Gemessen wurde hierbei an der gleichen Oozyte. Die aufgezeigte Potenzierung des GABA vermittelten Stroms durch Diazepam ist auf den Einbau der γ – Untereinheit in den GABA_AR $\alpha 1\beta 2$ zurückzuführen.

Hoch- bzw. höchstsignifikant ist die Verringerung der apparenten GABA – Affinität nach Ko – Expression der γ – Untereinheit bei GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ ($11,99 \pm 0,54\mu\text{M}^{**}$) und GABA_AR $\alpha 2\beta 3$ ($46,53 \pm 11,98\mu\text{M}^{***}$) (Abb. 4.13). Die γ – Untereinheit erhöht demzufolge bei den ausgewählten GABA_AR – Kompositionen den EC₅₀ – Wert. Ob nun Gephyrin und Collybistin II SH3- noch in der Lage sind die schon deutlich verringerte apparente GABA - Affinität noch weiter zu verringern sollten die nachfolgenden Experimente klären. Hierzu wurden GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$ und GABA_AR $\alpha 2\beta 3\gamma 2s$ mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ko – exprimiert.

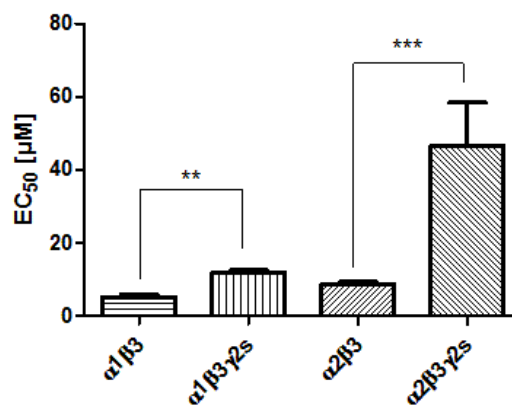


Abb. 4.13: Dargestellt sind die EC₅₀ – Werte von GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ und GABA_AR $\alpha 2\beta 3$ nach Ko – Expression mit der γ – Untereinheit. Als Referenzen wurden jeweils die EC₅₀ – Werte der jeweiligen GABA_AR – Komposition ohne Ko – Expression mit der γ – Untereinheit aus Tab. 4.2 mit aufgetragen. Nach der Ko – Expression der γ – Untereinheit mit den jeweiligen GABA_AR – Kompositionen konnten folgende EC₅₀ – Werte ermittelt werden. Für GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$ ($11,99 \pm 0,54\mu\text{M}$), n=5; GABA_AR $\alpha 2\beta 3\gamma 2s$ ($46,53 \pm 11,98\mu\text{M}$), n=11. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Signifikanzen wurden mittels ungepaarten t-test ($p < 0,05$) zur jeweiligen Referenz ermittelt.

Tab. 4.3 zeigt, dass keine Verringerung der GABA – Affinität durch die Anwesenheit von Gephyrin und Collybistin II SH3- bei GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$ zu beobachten war. Sowohl die EC₅₀ – Werte von GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$ nach Ko - Expression mit Gephyrin ($8,26 \pm 1,59\mu\text{M}(\text{ns})$) sowie GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$ nach Ko - Expression mit Collybistin II SH3- ($14,03 \pm 3,78\mu\text{M}(\text{ns})$) als auch GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$ nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ($11,69 \pm 2,28\mu\text{M}(\text{ns})$) zeigten keinen signifikanten Unterschied zu GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$.

Tab. 4.3: Zusammenfassung der EC₅₀ – Werte und maximal induzierbaren Ströme von GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$, GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$ und GABA_AR $\alpha 2\beta 3\gamma 2s$ nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin SH3-. Die eingetragenen Signifikanzen beziehen jeweils auf eine GABA_AR – Zusammensetzung und wurden mittels one-way ANOVA - Test ($p < 0,05$) ermittelt.

Konstrukte	Stichproben (n)	EC50 [μ M]	I _{max} [μ A]
$\alpha 1\beta 3\gamma 2s$	5	11,99 \pm 0,54	5,15 \pm 0,96
$\alpha 1\beta 3\gamma 2s/geph$	5	8,26 \pm 1,59	9,02 \pm 1,24 (*)
$\alpha 1\beta 3\gamma 2s/cbII\ SH3-$	4	14,03 \pm 3,78	6,57 \pm 0,61
$\alpha 1\beta 3\gamma 2s/geph/cbII\ SH3-$	5	11,69 \pm 2,28	8,2 \pm 0,6
$\alpha 2\beta 3\gamma 2s$	11	46,52 \pm 11,98	4,08 \pm 0,53
$\alpha 2\beta 3\gamma 2s/geph$	10	50,84 \pm 13,35	4,41 \pm 0,79
$\alpha 2\beta 3\gamma 2s/cbII\ SH3-$	8	40,51 \pm 12,35	4,64 \pm 0,93
$\alpha 2\beta 3\gamma 2s/geph/cbII\ SH3-$	10	36,68 \pm 10,91	5,12 \pm 0,93

Die Auswertung von der GABA_AR $\alpha 2\beta 3\gamma 2s$ Komposition zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen im EC₅₀ – Wert nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-.

Fazit: Die Insertion der γ – Untereinheit in die GABA_AR Komplexe $\alpha 2\beta 3$ und $\alpha 1\beta 3$ führt zu einer höchstsignifikanten Erhöhung des EC₅₀ – Wertes. Nach Ko-Expression von GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$ oder GABA_AR $\alpha 2\beta 3\gamma 2s$ mit Gephyrin und oder CbII SH3- ist keine signifikante Erhöhung des EC₅₀ – Wertes festzustellen.

4.11 Einfluss von Gephyrin und Collybistin II SH3- auf die apparente Liganden – Affinität von NMDARs

In dem nachfolgendem Experiment sollte untersucht werden, ob die Verankerungsproteine Gephyrin und Collybistin II SH3- einen Einfluss auf die Funktionalität des ionotropen Glutamatrezeptors N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) besitzen. Der NMDAR wird hauptsächlich durch den Liganden Glutamat und den Co-Agonisten Glyzin aktiviert. Im Gegensatz zu den zur cys-loop Familie gehörenden Rezeptoren, welche einen pentameren Aufbau besitzen, zeichnen sich die NMDARs durch einen tetrameren Aufbau aus und leiten hauptsächlich Na⁺ und Ca²⁺ durch die

Kanalpore. Im nativen Zustand können die NMDARs nicht mit Gephyrin und Collybistin wechselwirken. Um dies zu gewährleisten wurde nahe dem C-Terminus ein Gephyrin – Bindemotiv in die NR1 – Untereinheit inseriert (siehe Abb. 4.14).

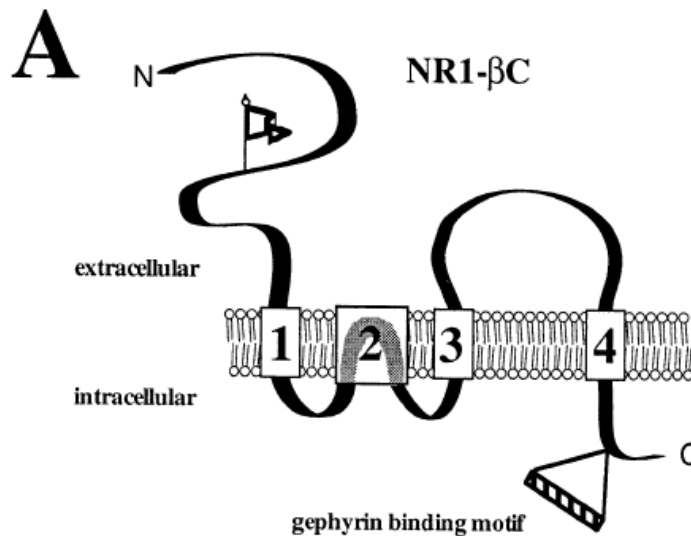


Abb. 4.14: Dargestellt ist die NR1 – Untereinheit mit einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne, vier Transmembrandomänen und einem intrazellulären C-Terminus. Nahe des C-Terminus wurde das Gephyrin – Bindemotiv eingebracht. (Kins et al. 1999)

4.12 Gephyrin und Collybistin II SH3- verringern die apparente Glyzin – und Glutamat – Affinität des NMDAR

Da sowohl Glyzin als auch Glutamat für eine Kanalöffnung benötigt werden wurde ein Agonist stets mit einer sättigenden Konzentration und der jeweilig andere mit aufsteigender Konzentration appliziert. Nach Auswertung der Glyzin und Glutamat abhängigen Dosis – Wirkungskurven konnten die EC_{50} – Werte ermittelt werden (Abb. 4.15). Es stellte sich heraus, dass die apparente – Glyzin Affinität von NR1 β C/NR2A ($1,66 \pm 0,4\mu M$, $n=13$) nicht durch Ko – Expression mit Gephyrin ($1,55 \pm 0,41\mu M$ (ns)) aber durch Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ($3,77 \pm 0,55\mu M$ (*)) signifikant verringert wurde. Ebenfalls signifikant ist die Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität von NR1 β C/NR2A/geph im Vergleich zu NR1 β C/NR2A/geph/cbII SH3-.

Der NMDAR bestehend aus NR1/NR2A ($0,87 \pm 0,09\mu\text{M}$), welcher nicht mit Gephyrin interagieren kann, zeigt keine signifikante Veränderungen im EC_{50} – Wert nach Ko – Expression mit Gephyrin ($1,12 \pm 0,58\mu\text{M}(\text{ns})$) oder nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ($1,01 \pm 0,56\mu\text{M}(\text{ns})$). Ähnliche Resultate waren bei den Glutamat abhängigen EC_{50} – Werten zu beobachten. NR1 β C/NR2A ($2,21 \pm 0,23\mu\text{M}$) zeigte keine signifikante Erhöhung des EC_{50} – Wertes nach Ko – Expression mit Gephyrin ($1,78 \pm 0,13\mu\text{M}(\text{ns})$) aber nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ($3,63 \pm 0,61\mu\text{M}, n=5(*)$). Hochsignifikant unterschiedlich waren ebenfalls die EC_{50} – Werte von NR1 β C/NR2A/geph und NR1 β C/NR2A/geph/cbII SH3-. NR1/NR2A ($1,04 \pm 0,29\mu\text{M}$), zeigte keine signifikante Veränderungen im EC_{50} – Wert nach Ko – Expression mit Gephyrin ($2,02 \pm 1,39\mu\text{M}(\text{ns})$) oder nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- ($1,52 \pm 0,43\mu\text{M}(\text{ns})$).

Fazit: Nach den Ergebnissen zu urteilen, scheint eine Verringerung der apparenten Liganden – Affinität des NMDAR erst durch eine Interaktion mit Gephyrin aufzutreten. Die Verringerung der apparenten Liganden – Affinität kann aber nicht durch Gephyrin alleine gewährleistet werden. In Tab. 4.4 aufgelistet ist die Kontrolle NR1 β C/NR2A/cbII SH3- welche keine signifikanten Unterschiede in den EC_{50} – Werten im Vergleich zu NR1 β C/NR2A aufweist.

Tab 4.4. Zusammenfassung der mit NR1 β C/NR2A und NR1/NR2A generierten EC_{50} – Werte und der maximal induzierbaren Ströme nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3. Die eingetragenen Signifikanzen beziehen jeweils auf eine NMDAR – Komposition, welche separiert dargestellt sind und wurden mittels one-way ANOVA - Test ($p<0,05$) und ungepaarten t-test ($p<0,05$) ermittelt.

Konstrukte	Stichprobe (n)	EC_{50} (Gly) [μM]	I_{max} (Gly) [μA]	EC_{50} (Glu) [μM]	I_{max} (Glu) [μA]
NR1 β C/NR2A	13	$1,66 \pm 0,4$	$3,44 \pm 0,18$	$2,21 \pm 0,23$	$3,58 \pm 0,2$
NR1 β C/NR2A/geph	7	$1,55 \pm 0,41$	$5,46 \pm 0,39 (***)$	$1,78 \pm 0,13$	$5,89 \pm 0,54 (***)$
NR1 β C/NR2A/geph/cbII SH3-	5	$3,77 \pm 0,55 (*)$	$2,43 \pm 0,26 (*)$	$3,63 \pm 0,61 (*)$	$2,77 \pm 0,17$
NR1 β C/NR2A	6	$5,6 \pm 0,34$	$1,73 \pm 0,16$	$6,97 \pm 0,74$	$1,6 \pm 0,17$
NR1 β C/NR2A/cbII SH3-	5	$4,61 \pm 0,9$	$2,18 \pm 0,33$	$5,6 \pm 0,78$	$2,42 \pm 0,28 (*)$
NR1/NR2A	4	$0,87 \pm 0,09$	$3,99 \pm 0,52$	$1,04 \pm 0,29$	$3,94 \pm 0,47$
NR1/NR2A/geph	3	$1,12 \pm 0,58$	$4,24 \pm 0,18$	$2,02 \pm 1,39$	$3,77 \pm 0,53$
NR1/NR2A/geph/cbII SH3-	4	$1,01 \pm 0,56$	$3,91 \pm 0,07$	$1,52 \pm 0,43$	$4,08 \pm 0,04$

Collybistin II SH3- kann demnach ohne Gephyrin die apparente Liganden – Affinität nicht verringern. Analog zu den Beobachtungen aus den Experimenten mit dem GlyR muss anscheinend für den aufgezeigten Effekt sowohl Gephyrin als auch Collybistin II SH3- anwesend sein.

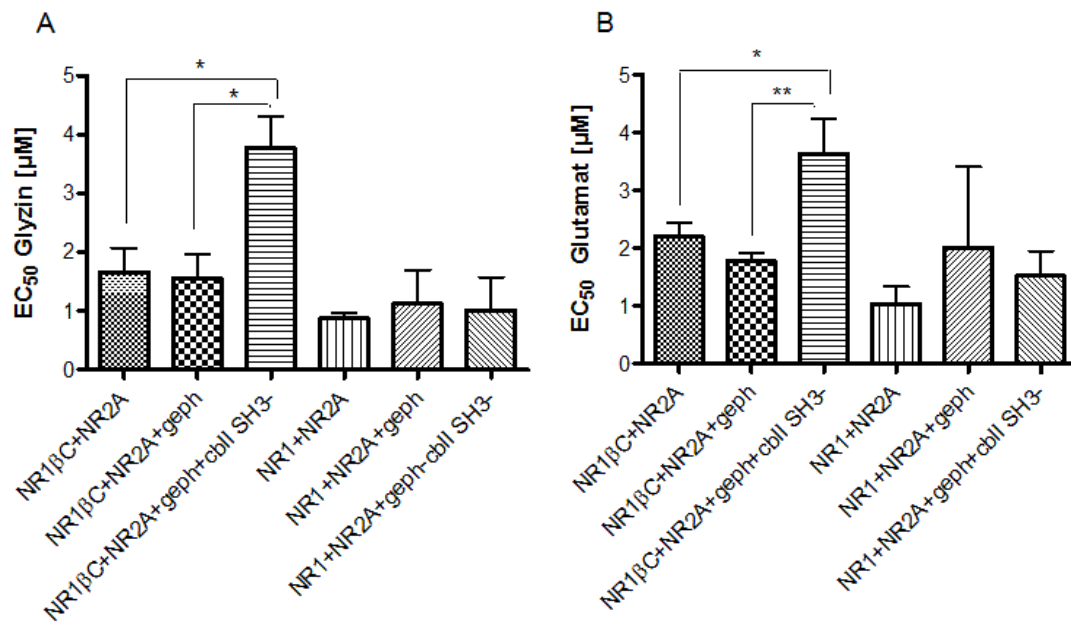


Abb. 4.15: Auswirkungen von Gephyrin und Collybistin II SH3- auf die apparente Liganden – Affinität (Glyzin/Glutamat) von NR1βC/NR2A und der mit Gephyrin nicht wechselwirkenden Kontrolle NR1/NR2A. (A) Sättigende Glutamat – Konzentration und aufsteigende Glyzin – Konzentration. Folgende EC₅₀ – Werte konnten ermittelt werden. Für NR1βC/NR2A ($1,66 \pm 0,4\mu\text{M}$), n=13; NR1βC/NR2A/geph ($1,55 \pm 0,41\mu\text{M}$), n=7; und NR1βC/NR2A/geph/cbII SH3- ($3,77 \pm 0,55\mu\text{M}$), n=5. Für die nicht Gephyrin bindende Kontrolle NR1/NR2A konnten folgende EC₅₀ – Werte ermittelt werden. NR1/NR2A ($0,87 \pm 0,09\mu\text{M}$), n=4; NR1/NR2A/geph ($1,12 \pm 0,58\mu\text{M}$), n=3 und NR1/NR2A/geph/cbII SH3- ($1,01 \pm 0,56$), n=4. (B) Sättigende Glyzin – Konzentration und aufsteigende Glutamat – Konzentration. Folgende EC₅₀ – Werte konnten ermittelt werden. NR1βC/NR2A ($2,21 \pm 0,23\mu\text{M}$), n=13; NR1βC/NR2A/geph ($1,78 \pm 0,13\mu\text{M}$), n=7 und NR1βC/NR2A/geph/cbII SH3- ($3,63 \pm 0,61\mu\text{M}$), n=5. Für die nicht Gephyrin bindende Kontrolle NR1/NR2A konnten folgende EC₅₀ – Werte ermittelt werden. NR1/NR2A ($1,04 \pm 0,29\mu\text{M}$), n=4; NR1/NR2A/geph ($2,02 \pm 1,39\mu\text{M}$), n=3 und NR1/NR2A/geph/cb II SH3- ($1,52 \pm 0,43\mu\text{M}$), n=4.

4.13 Die Interaktion von Gephyrin und Collybistin II SH3- mit GlyR $\alpha 1$ -gbm führt zu einer drastischen Reduktion des Taurin vermittelten maximal induzierbaren Stroms

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass Gephyrin und Collybistin II SH3- die apparente Glyzin – Affinität von GlyRs, GABA_ARs und NR1 β C/NR2A verringern, sofern die Rezeptoren eine Bindestelle für Gephyrin aufwiesen oder im Falle von GABA_ARs $\alpha 2$ eine Bindestelle für Collybistin. In dem nachfolgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Wechselwirkung von Gephyrin und Collybistin II SH3- mit membranständigen Rezeptoren die Wirkungsweise von partiellen Agonisten beeinflusst. Um dies zu untersuchen wurde für das nächste Experiment der partielle Agonist Taurin des GlyR nach Ko – Expression mit Gephyrin und/oder Collybistin mithilfe des GlyR $\alpha 1$ -gbm – Konstrukts vermessen. Es wurden Taurin und Glyzin vermittelte Dosis – Wirkungskurven in einer gepaarten Analyse aufgenommen und sowohl die EC₅₀ – Werte als auch die maximal induzierbaren Ströme miteinander verglichen (Abb. 4.16).

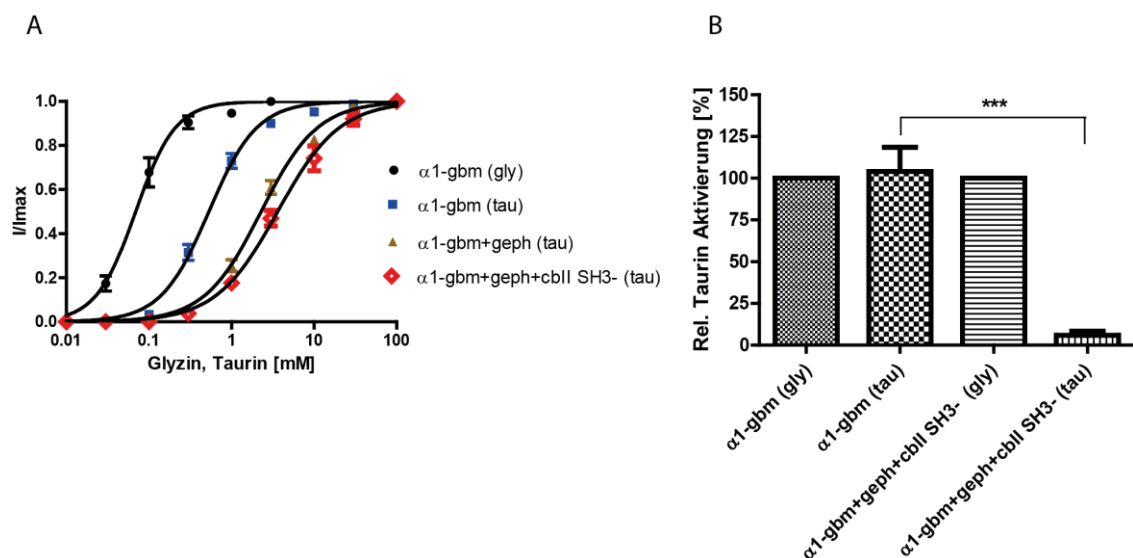


Abb. 4.16: Dargestellt sind die Glyzin und Taurin vermittelten Dosis – Wirkungskurven und deren maximal induzierten Ströme am GlyR $\alpha 1$ -gbm nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-. (A) Als Kontrolle wurde die Dosis – Wirkungskurve von GlyR $\alpha 1$ -gbm, gly (•), n=10 nach Glyzin – Applikation mit aufgetragen. Die Werte der Dosis-Wirkungskurven gehen aus den gemittelten Werten für GlyR $\alpha 1$ -gbm, tau (■), n=10; GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph, tau (▲), n=8 und GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph/cbII SH3-, tau (◆), n=6 hervor. Es konnten folgende EC₅₀ – Werte ermittelt werden. Für GlyR $\alpha 1$ -gbm, gly ($70 \pm 17 \mu\text{M}$), GlyR $\alpha 1$ -gbm, tau ($512 \pm 47 \mu\text{M}$); GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph, tau ($2434 \pm 286 \mu\text{M}$) und für GlyR $\alpha 1$ -

gbm/geph/cbII SH3-, tau(4356 ± 683µM). (B) Die gemittelten Glyzin – Ströme wurden auf 100% normiert und die Taurin - Ströme relativ dazu aufgetragen. Ein höchstsignifikanter Unterschied in der Aktivierung ist zwischen GlyR α1-gbm, tau (104 ± 15%) und GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3-, tau (6 ± 2%) zu beobachten. Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet. Signifikanzen wurden mit dem ANOVA – Test (p<0,05) ermittelt.

Als Kontrolle wurde GlyR α1-gbm, gly (70 ± 17µM) aufgetragen. GlyR α1-gbm, tau (512 ± 62 µM) zeigte nach Ko – Expression mit Gephyrin (2434 ± 286µM(***)) eine höchstsignifikante Verringerung der apparenten Taurin - Affinität nach Ko – Expression von Gephyrin. Ebenfalls höchstsignifikant ist der Unterschied zwischen GlyR α1-gbm/geph, tau und GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3-, tau (4356 ± 683µM(***)). Die Glyzin und Taurin vermittelten maximal Ströme am GlyR α1-gbm zeigen ohne Gephyrin und Collybistin II SH3- keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Glyzin und Taurin Applikation am GlyR α1-gbm mit und ohne Ko – Expression von Gephyrin und Collybistin II SH3-. Signifikanzen beziehen sich jeweils auf GlyR α1-gbm (Glyzin oder Taurin) bei den EC₅₀ – Werten (ANOVA;p<0,05). Bei den maximal induzierten Strömen wurden die Glyzin und Taurin Werte der jeweiligen Konstrukte durch eine gepaarte Analyse mittels t-test (p<0,05) miteinander verglichen.

Konstrukte	Ligand	Stichproben (n)	EC50 [µM]	I _{max} [µA]
α1-gbm	Glyzin	10	70 ± 17	3,82 ± 0,3
α1-gbm/geph	Glyzin	8	189 ± 13(*)	4,06 ± 0,53
α1-gbm/geph/cbII SH3-	Glyzin	6	707 ± 112(***)	1,99 ± 0,16
α1-gbm	Taurin	10	512 ± 47	3,91 ± 0,3
α1-gbm/geph	Taurin	8	2434 ± 286 (***)	1,72 ± 0,16 (**)
α1-gbm/geph/cbII SH3-	Taurin	6	4356 ± 683 (***)	0,11 ± 0,05 (***)

Äußerst auffällig ist jedoch die drastische Reduktion beim Taurin vermittelten maximal Strom nach Wechselwirkung mit Gephyrin und Collybistin II SH3- auf nur noch ca. 6% (***) des Glyzin vermittelten maximalen Stroms. Eine hochsignifikante Verringerung des Taurin vermittelten Stroms ist auch bei GlyR α1-gbm/geph, tau (**) zu beobachten (Tab. 4.5).

4.15 Einfluss der SH-, DH- und PH-Domäne von Collybistin auf die apparente Glyzin - Affinitätsverringern

In nachfolgenden Studien sollte nun mittels dem GlyR $\alpha 1$ -gbm eruiert werden welche Eigenschaften der Gerüstproteine Gephyrin und Collybistin für die Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität verantwortlich sind.

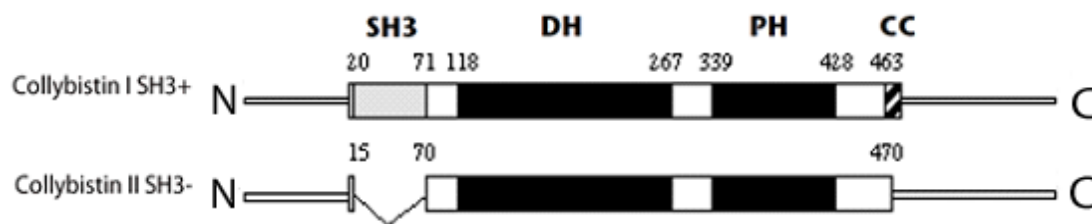


Abb. 4.17: Domänenstruktur von Collybistin I SH3+ und Collybistin II SH3- (Modifiziert nach Kins et al., 2000).

Kins et al. zeigten 2000, dass Collybistin II SH3- aber nicht Collybistin I SH3+ nach Ko-Expression mit Gephyrin in HEK293-Zellen in der Lage ist intrazellulär angereichertes Gephyrin zur Plasmamembran zu translokieren. Es konnte außerdem schon an homologen GEFs Asef 1 und 2 (Hamann et al., 2007; Mitin et al., 2007) gezeigt werden, dass die SH3 – Domäne eine auto-inhibitorische Funktion besitzt. Um der Fragestellung nachzugehen, ob die SH3-Domäne einen Einfluss auf die Verschiebung des EC_{50} – Wertes durch Collybistin besitzt, wurden Collybistin I SH3+, Collybistin II SH3+ und Collybistin II SH3- mit GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin ko-exprimiert (Abb. 4.18). Nach demselben Schema sollte der Einfluss der katalytisch aktiven DH- und der mit PI3P wechselwirkenden PH – Domäne auf die Collybistin medierte apparente Glyzin – Affinitäts Verringerung des GlyR $\alpha 1$ -gbm näher untersucht werden. Hierzu sollten Collybistin DH- bzw. PH-defiziente Mutanten eingesetzt werden.

4.16 Die SH3 – Domäne von Collybistin schwächt die Erhöhung des EC₅₀ – Wertes von GlyR α 1-gbm ko-exprimiert mit Gephyrin ab

Es zeigte sich in diesem Experiment, dass Collybistin I SH3+ ko-exprimiert mit GlyR α 1-gbm/Gephyrin ($382 \pm 56 \mu\text{M}^*$) signifikant den EC₅₀ – Wert von GlyR α 1-gbm/Gephyrin ($230 \pm 30 \mu\text{M}$) erhöht. Das konstitutiv aktive Collybistin II SH3- zeigte jedoch nach Ko-Expression mit GlyR α 1-gbm/Gephyrin ($904 \pm 80 \mu\text{M}^{***}$) eine höchstsignifikante Erhöhung des EC₅₀ – Wertes (Abb. 4.18)

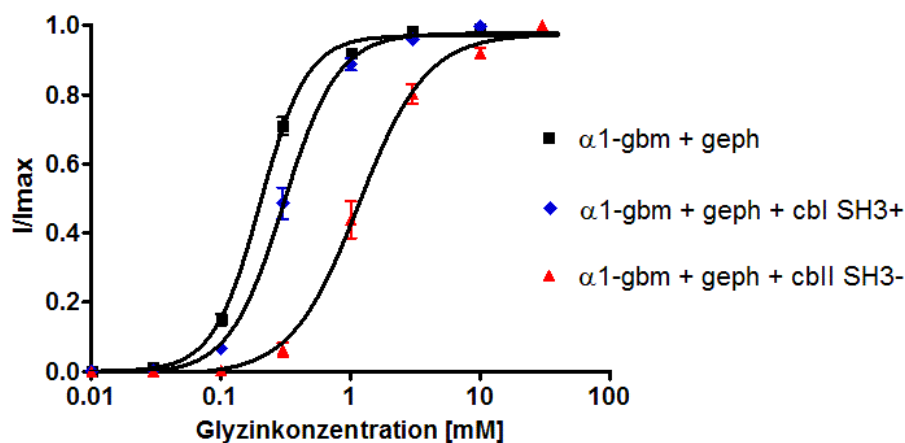


Abb.4.18: Glyzin-Dosis-Wirkungskurven von GlyR α 1-gbm nach Ko-Expression mit Gephyrin, Gephyrin/Collybistin I SH3+ und Gephyrin/Collybistin II SH3-. Die Werte für die Dosis-Wirkungskurven gehen aus den gemittelten Werten für GlyR α -gbm/geph (\blacksquare), $n=27$; GlyR α 1-gbm/geph/cbl SH3+ (\blacklozenge), $n=22$; GlyR α 1-gbm/geph /cbl II SH3- (\blacktriangle), $n=19$ hervor. Es konnten folgende EC₅₀ – Werte ermittelt werden. Für GlyR α 1-gbm/geph ($230 \pm 30 \mu\text{M}$), GlyR α 1-gbm/geph/cbl SH3+ ($382 \pm 56 \mu\text{M}$) und für GlyR α 1-gbm/geph /cbl II SH3- ($904 \pm 80 \mu\text{M}$).

Dies lässt die Vermutung zu, dass Collybistin I SH3+ weitestgehend inaktiv vorliegt. Möglicherweise beruhte die geringere Verschiebung des EC₅₀ – Wertes durch Collybistin I SH3+ jedoch auf einer schwächeren Expression im Vergleich zu Collybistin II SH3-. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde eine metabolische Markierung mit [³⁵S] – Methionin und anschließender Affinitätschromatographie von Gephyrin, Collybistin I SH3+ und Collybistin II SH3- durchgeführt.

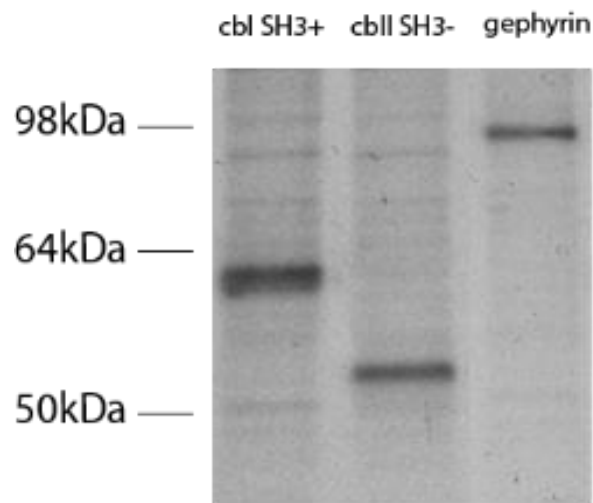


Abb. 4.19: SDS – PAGE nach metabolischer Markierung mit [35 S] – Methionin und Affinitätschromatographie mittels His – tag von Collybistin I SH3+, Collybistin II SH3- und Gephyrin. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte nach zwei Tagen Expression und Inkubation in [35 S] – Methionin haltigem Medium. Die Markerbanden sind links in kDa aufgetragen.

Die Abb. 4.19 zeigt die Gelspuren von Collybistin I SH3+, Collybistin II SH3- und Gephyrin. In der ersten Gelspur ist eine Bande bei ca. 61kDa zu detektieren. Dies entspricht dem Molekulargewicht von Collybistin I SH3+ (Kins et al., 2000). Die zweite Gelspur zeigt eine Bande bei ca. 53 kDa welches dem Molekulargewicht von Collybistin II SH3- entspricht. Der unterschiedliche Verlauf von Collybistin I SH3+ und Collybistin II SH3- ist auf die 51 Aminosäuren große SH3 – Domäne zurückzuführen, welche ein Molekulargewicht von ca. 6 kDa besitzt. In der dritten Gelspur ist eine Bande bei ca. 98 kDa zu erkennen welches auf das 93kDa große Gephyrin (Pfeiffer et al., 1982) schließen lässt. Es konnte keine Verringerung der Expressionstärke von Collybistin I SH3+ im Vergleich zu Collybistin II SH3- festgestellt werden.

Fazit: In dem vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass die SH3 – Domäne eine inhibierende Funktion auf die Collybistin medierte apparente Glyzin – Affinitätsverschiebung besitzt.

4.17 NL2 verringert die apparente Glyzin-Affinität des GlyR $\alpha 1$ -gbm nach Ko - Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3+

In dem nachfolgenden Experiment sollte ermittelt werden, ob Neuroligin 2 oder Neuroligin 4, im heterologen Expressionssystem Oozyte, in der Lage sind Collybistin II SH3+ zu aktivieren. Diese beiden membranständigen Proteine können mittels einem zytoplasmatisch konservierten Motiv Gephyrin binden und besitzen auch die Fähigkeit durch Anlagerung an die SH3-Domäne mit inaktivem Collybistin zu interagieren. Es wird vermutet, dass die Interaktion von NL2 mit der SH3 – Domäne die Konformation von Collybistin so ändert, dass die katalytische Eigenschaft der DH – Domäne und die Membranwechselwirkung der PH - Domäne zum Tragen kommen (Papadopoulos et al., 2011). In dem vorangegangenen Experiment (Kap. 4.16) lag noch nicht die Collybistin II SH3+ Variante vor. Aus diesem Grund wurde Collybistin I SH3+ zuerst verwendet um einen möglichen inhibitorischen Effekt der SH3 – Domäne zu untersuchen. Für das nachfolgende Experiment wurde Collybistin II SH3+ verwendet.

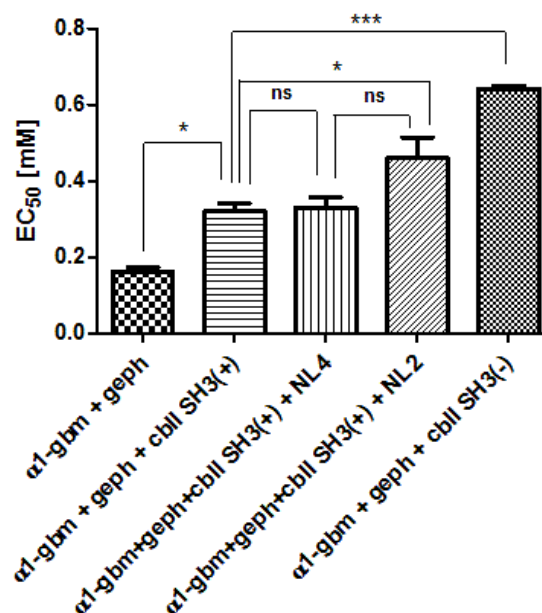


Abb. 4.20: Dargestellt sind die EC₅₀ – Werte von GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin ko - exprimiert mit Collybistin II SH3+, GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin ko - exprimiert mit Collybistin II SH3+/NL2 oder NL4 und GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin ko - exprimiert mit Collybistin II SH3-. Folgende EC₅₀ – Werte konnten ermittelt werden. GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph (162 ± 10μM), n=5; GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph/cbII SH3+ (335 ± 26μM), n=10; GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph/cbII SH3+/NL4 (330 ± 28μM), n=5; GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph/cbII SH3+/NL2 (459 ± 55μM), n=11 und

GlyR α 1-gbm/geph/cbII SH3- ($642 \pm 8 \mu\text{M}$), $n=5$. Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet. Signifikanzen wurden mit dem ANOVA – Test ($p<0,05$) ermittelt.

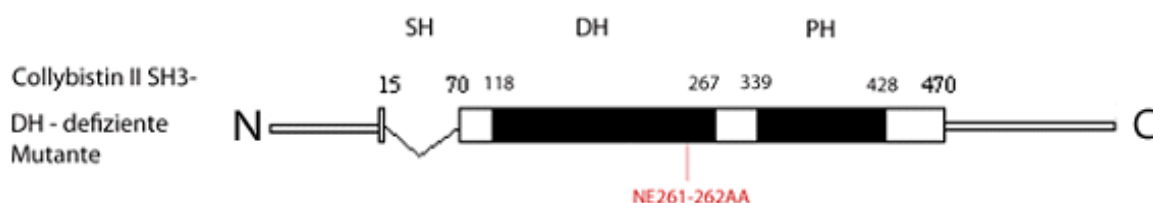
Es zeigte sich in diesem Experiment, dass Collybistin II SH3+ ko-exprimiert mit GlyR α 1-gbm/Gephyrin ($335 \pm 26 \mu\text{M}^*$) signifikant den EC_{50} – Wert von GlyR α 1-gbm/Gephyrin ($162 \pm 10 \mu\text{M}$) erhöht (Abb. 4.20). Dieses Ergebnis spiegelt auch die Resultate aus Kap. 4.16 wider. Sowohl Collybistin I SH3+ als auch Collybistin II SH3+ erhöhen den EC_{50} -Wert von GlyR α 1-gbm/Gephyrin in etwa auf den gleichen Wert.

Weiterhin wurde ersichtlich, dass NL2 ($459 \pm 55 \mu\text{M}^*$) aber nicht NL4 ($330 \pm 28 \mu\text{M}(\text{ns})$) ko-exprimiert mit GlyR α 1-gbm/Gephyrin/Collybistin II SH3+ in der Lage ist eine signifikante Erhöhung des EC_{50} – Werts hervorzurufen. GlyR α 1-gbm/Gephyrin ko - exprimiert mit Collybistin II SH3- ($642 \pm 8 \mu\text{M}^{***}$) zeigte eine höchstsignifikante Erhöhung des EC_{50} - Werts im Vergleich zu GlyR α 1-gbm/Gephyrin/Collybistin II SH3+.

Fazit: Es konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass NL2 nach Ko – Expression mit GlyR α 1-gbm/Gephyrin in der Lage ist Collybistin II SH3+ möglicherweise zu aktivieren und somit zu einer Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität beizutragen.

4.18 Die verankernde DH- und die katalytische PH – Domäne sind essenziell für die Verringerung der apparenten Glyzin - Affinität durch Collybistin II SH3-

Um die Wichtigkeit der katalytisch aktiven DH – Domäne und der für die Membranwechselwirkung verantwortlichen PH – Domäne an der Erniedrigung des EC_{50} – Werts durch Collybistin II SH3- zu untersuchen wurden DH- und PH – defiziente Mutanten von Collybistin II SH3- elektrophysiologisch untersucht (Abb. 4.21).



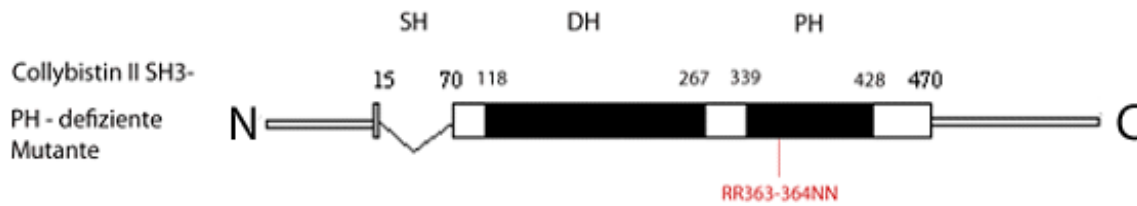


Abb. 4.21: Darstellung der Punktmutationen von Collybistin II SH3-, welche die katalytische Funktion der DH – Domäne und die PI3P – wechselwirkende Funktion der PH-Domäne ausschalten.

Die DH – Mutante ist nicht mehr in der Lage mit der GTPase Cdc42 zu interagieren und diese zu aktivieren. Die PH – Mutante hat die Fähigkeit verloren mit membranständigen PI3P zu interagieren und verhindert somit die Anlagerung von Collybistin an die Membran. .

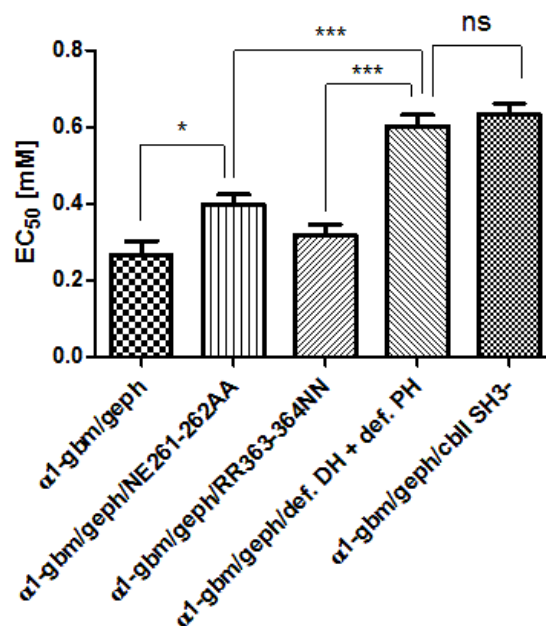


Abb. 4.22: Dargestellt sind die EC₅₀ – Werte von GlyR α1-gbm/Gephyrin ko-exprimiert mit Collybistin II SH3- ΔDH, Collybistin II SH3- ΔPH und Ko – Expression beider Defizienzmutanten Collybistin II SH3- ΔDH, ΔPH. Für die EC₅₀ – Werte wurden folgende Werte ermittelt: GlyR α1-gbm/geph (267 ± 36 μM), n=10; GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3- ΔDH (397 ± 27 μM), n=11; GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3- ΔPH (318 ± 28 μM), n=11; GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3- ΔDH, ΔPH (602 ± 20 μM), n=5 und GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3- (633 ± 28 μM), n=10. Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet. Signifikanzen wurden mit dem ANOVA – Test (p<0,05) ermittelt.

Es zeigte sich, dass durch die Ko - Expression von GlyR α1-gbm/Gephyrin nur mit der NE261-262AA – Mutante (DH – Domäne) von Collybistin II SH3- (397 ± 27 μM(***))

und nur der RR363-364NN – Mutante (PH-Domäne) von Collybistin II SH3- ($318 \pm 28 \mu\text{M}(***)$) jeweils eine höchstsignifikante Verringerung des EC_{50} – Werts im Vergleich zu GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin ko – exprimiert mit Collybistin II SH3- beobachtet werden konnte. Außerdem konnte festgehalten werden, dass die Collybistin II SH3- NE261-262AA Mutante signifikant unterschiedlich zu GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin war. Bemerkenswerterweise zeigte sich auch, dass nach Ko – Expression von GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin mit der DH – und der PH – Mutante von Collybistin II SH3- ($602 \pm 20 \mu\text{M}$) kein signifikanter Unterschied zu GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin/Collybistin SH3- ($633 \pm 28 \mu\text{M}(\text{ns})$) festzustellen war (Abb. 4.22). Dieser Effekt könnte sich womöglich daraus erklären, dass Collybistin als Dimer vorliegen könnte. Bislang gab es hierzu noch keine Studien.

Fazit: Es konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass für die Collybistin II SH3- medierte Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität eine funktionsfähige PH – Domäne vorhanden sein muss. Der Einfluss der DH – Domäne auf den Collybistin II SH3- medierten Effekt fiel im Vergleich mit der PH – Domäne geringer aus.

4.19 Der Einfluss von Gephyrin und seinen Eigenschaften auf die apparente Glyzin - Affinität des GlyR $\alpha 1$ -gbm

Um die in den vorherigen Experimenten aufgezeigten Effekte auf den EC_{50} – Wert des GlyR besser verstehen zu können, sollte in den nachfolgenden Versuchen der Einfluss von Gephyrin auf die Glyzin - Affinitätsverschiebung genauer untersucht werden. Zuerst wurde ein Gephyrin – Konstrukt verwendet (E_{mut}) welches nicht die Fähigkeit besitzt das Gephyrin – Bindemotiv in der großen intrazellulären Schleife des GlyR zu binden (Abb. 4.23).



Abb. 4.23: Darstellung der β – Untereinheit bindedefizienten (E_{mut}) Gephyrin - Mutante, Gephyrin – Trimerisierungs - Mutante (G_{4xR}) und der Gephyrin - Dimerisierungs – Mutante (E_{RER})

Jedoch noch die Fähigkeit besitzt zu dimerisieren. Weiterhin sollten noch die Auswirkungen der Di- und Trimerisierungseigenschaften des Gephyrins näher untersucht werden.

4.20 Die Gephyrin – GlyR $\alpha 1$ -gbm Wechselwirkung ist erforderlich für die Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität

Um die Wichtigkeit der GlyR $\alpha 1$ -gbm – Gephyrin Bindung für die durch Gephyrin und Collybistin II SH3- hervorgerufene apparente Glyzin – Affinitätsverschiebung zu untersuchen wurde ein Gephyrin Konstrukt verwendet welches defizient für die GlyR $\alpha 1$ -gbm Interaktion ist. Nach Aufnahme der Glyzin – Dosiswirkungskurven und ermitteln der EC_{50} – Werte konnte folgendes festgehalten werden. Es wurde kein signifikanter Unterschied von GlyR $\alpha 1$ -gbm /cbII SH3- ($404 \pm 39\mu M$) im Vergleich zu GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph E_{mut} /cbII SH3- ($474 \pm 39\mu M$) festgestellt. Jedoch konnte ein hochsignifikanter Unterschied zwischen GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph/cbII SH3- ($750 \pm 81\mu M(**)$) und GlyR $\alpha 1$ -gbm/geph E_{mut} /cbII SH3- beobachtet werden (Abb.4.24).

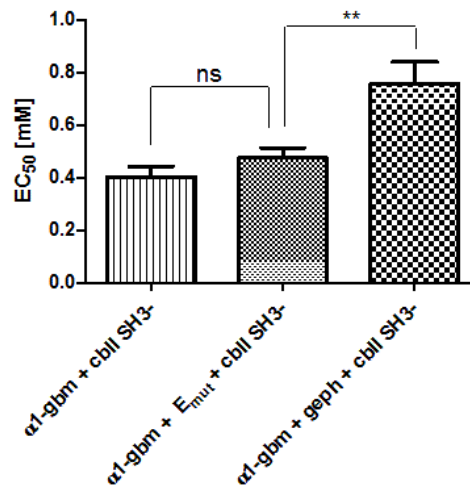


Abb. 4.24: Einfluss der Gephyrin – GlyR α1-gbm Interaktion auf die apparente Glyzin - Affinität des GlyR α1-gbm mit Collybistin SH3-. Dargestellt sind die gemittelten EC₅₀- Werte von GlyR α1-gbm/cbII SH3- (404 ± 39 μM), n=9; GlyR α1-gbm/E_{mut}/cbII SH3- (474 ± 39 μM), n=10 und GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3- (750 ± 81 μM, n=12. Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet. Signifikanzen wurden mit dem ANOVA – Test (p<0,05) ermittelt.

Fazit: Die Verringerung der apparenten Glyzin - Affinität am GlyR α1-gbm durch Gephyrin und Collybistin II SH3- scheint demzufolge abhängig von einer Gephyrin – GlyR α1-gbm Interaktion zu sein.

4.21 Die Di- und Trimerisierungseigenschaften von Gephyrin beeinflussen die Verringerung der apparenten Glyzin - Affinität des GlyR α1-gbm

Um der Frage nachzugehen ob die Di – und Trimerisierung des Gephyrins für die Verschiebung der apparenten Glyzin – Affinität beim GlyR α1-gbm eine wichtige Rolle einnimmt wurde ein Gephyrin – Konstrukt verwendet (G_{4xR}, E_{RER}), welches nicht die Fähigkeit besitzt zu dimerisieren und zu trimerisieren (Abb. 4.25). Als Kontrolle dienten hierbei die Ergebnisse von GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3- und GlyR α1-gbm /cbII SH3- aus Abb. 4.24. Es ist kein signifikanter Unterschied in den EC₅₀- Werten von GlyR α1-gbm/cbII SH3- im Vergleich zu GlyR α1-gbm/G_{4xR}, E_{RER}/cbII SH3- (461 ± 29 μM(ns)) festzustellen. Jedoch ist ein hochsignifikanter Unterschied zwischen GlyR α1-gbm/G_{4xR}, E_{RER}/cbII SH3- und GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3- zu beobachten.

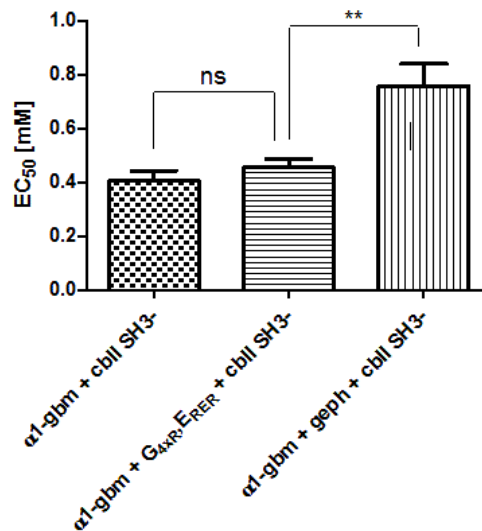


Abb. 4.25: Auswirkung des Verlusts von Gephyrin, auf die apparente Glyzin – Affinität des GlyR α1-gbm, Dimere und Trimere zu bilden. Als Kontrollen sind GlyR α1-gbm/cbII SH3- und GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3- aus Abb. 4.24 aufgetragen. Des Weiteren dargestellt ist der gemittelte EC₅₀ – Wert von GlyR α1-gbm/G_{4xR}-E_{RE}R/cbII SH3- (461 ± 29 μM), n=9. Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet. Signifikanzen wurden mit dem ANOVA – Test (p<0,05) ermittelt.

Demnach führt das Ausschalten der Di- und Trimerisierungsfähigkeit des Gephyrins zum Verlust der Gephyrin-wt medierten apparenten Glyzin – Affinitäts – Verringerung von GlyR α1-gbm. Es drängt sich hierbei die Frage auf ob die Di- bzw. Trimerisierungs – Fähigkeiten des Gephyrins gleichermaßen an diesem Effekt beteiligt sind. Um Aufschluss darüber zu erlangen wurden Gephyrin - Konstrukte verwendet, welche entweder nur die Dimerisierungsfähigkeit (E_{RE}R) oder die Trimerisierungsfähigkeit (G_{4xR}) ausschalten. Zuerst wurde die Trimerisierungsmutante (s. Abb. 4.26 (A)) untersucht. Es zeigten sich hierbei jeweils signifikante Unterschiede von GlyR α1-gbm/G_{4xR}/cbII SH3- (552 ± 51 μM(*)) zu den Kontrollen GlyR α1-gbm/cbII SH3- und GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3-. Das Verhindern der Trimerisierung von Gephyrin bewirkt im Vergleich mit dem Versuchsansatz ohne Gephyrin eine Erhöhung des EC₅₀ – Wertes. Im Vergleich zum wt-Gephyrin ist jedoch eine Erniedrigung des EC₅₀ – Wertes zu beobachten. Die Ergebnisse der Dimerisierungsmutante (s. Abb. 4.26 (B)) sind eindeutiger. Es zeigte sich hierbei ein hochsignifikanter Unterschied von GlyR α1-gbm/E_{RE}R/cbII SH3- (672 ± 66 μM(**)) zu GlyR α1-gbm/cbII SH3-. Nicht signifikant ist der Vergleich mit GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3-.

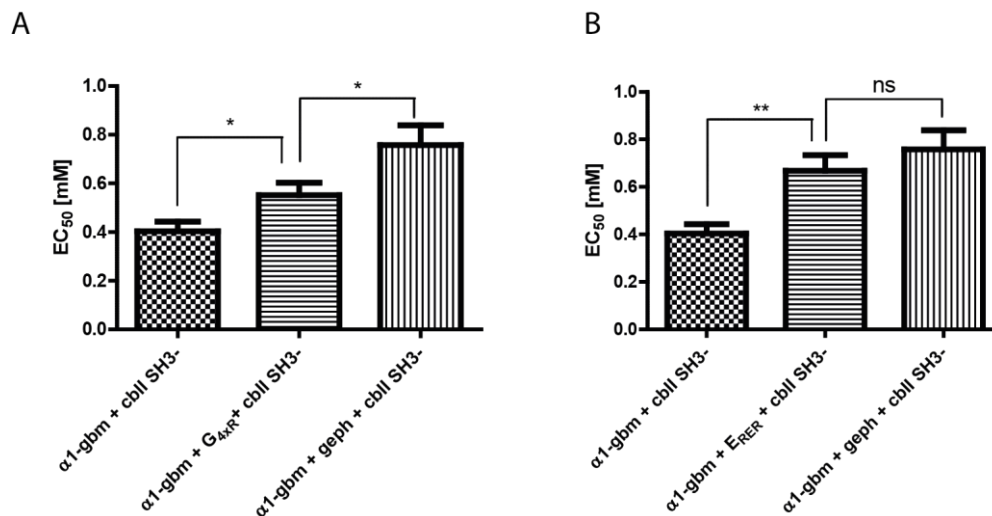


Abb. 4.26: Einfluss der Di- und Trimerisierungsfähigkeit von Gephyrin auf die apparente Glyzin – Affinität von GlyR α1-gbm. Dargestellt sind die gemittelten EC₅₀ – Werte von GlyR α1-gbm/cbII SH3- (n=9) und GlyR α1-gbm/geph/cbII SH3- (n=12) als Kontrolle in (A) und (B). (A) Des Weiteren abgebildet ist der gemittelte EC₅₀ – Wert von GlyR α1-gbm/G_{4xR}/cbII SH3- (552 ± 51μM), n=9. (B) Zu den oben erwähnten Kontrollen ist noch der gemittelte EC₅₀ – Wert von GlyR α1-gbm/E_{RER}/cbII SH3- (672 ± 66μM), n=11 dargestellt. Standardfehler sind jeweils in die Balken eingezeichnet. Signifikanzen wurden mit dem ANOVA – Test (p<0,05) ermittelt.

Das Ausschalten der Dimerisierungseigenschaft von Gephyrin führt dementsprechend zu einer Erhöhung des EC₅₀ – Wertes im Vergleich zum Versuchsansatz ohne Gephyrin. Die Dimerisierungsmutante verhält sich wie Gephyrin-wt. Daraus lässt sich ableiten, dass die Trimerisierungseigenschaft des Gephyrins für die apparente Glyzin – Affinitätsverschiebung von großer Bedeutung ist. Die Dimerisierungseigenschaft trägt zwar auch zu dem Effekt bei, der Anteil an der Affinitätsverschiebung scheint jedoch kleiner zu sein. Alle Ergebnisse der hier aufgezeigten Versuche mit mutierten full-length Gephyrinen sind nochmals in der Tabelle 4.6. zusammengetragen. Eingetragen ist die jeweilige Mutante ko – exprimiert mit GlyR α1-gbm/cbII SH3-. Zu den schon beschriebenen EC₅₀ – Werten sind ebenfalls die gemittelten maximal Ströme (I_{max}) aufgelistet. Es konnte zwischen den einzelnen Mutanten keine signifikanten Unterschiede in der Stromantwort ermittelt werden.

Tab. 4.6: Zusammenfassung der Auswirkungen von Gephyrin Di – und Trimerisierungsmutanten auf die apparente Glyzin – Affinität des GlyR $\alpha 1$ -gbm nach Ko – Expression mit Collybistin II SH3-. Die eingetragenen Signifikanzen beziehen sich auf den Gephyrin-wt. Die maximalen Ströme zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Konstrukt	Mögliche Auswirkung	Stichproben (n)	EC50 [μ M]	I _{max} [μ A]
Gephyrin-wt	normale Funktion	12	750 \pm 81	4,04 \pm 0,6
Gephyrin E _{mut}	keine gbm Interaktion	10	474 \pm 39 (**)	3,56 \pm 0,26
Gephyrin G _{4xR} , E _{REr}	Keine Di- und Trimerisierung	9	461 \pm 29 (**)	3,91 \pm 0,37
Gephyrin G _{4xR}	keine Trimerisierung	9	552 \pm 51 (*)	4,22 \pm 0,33
Gephyrin E _{REr}	keine Dimerisierung	11	672 \pm 66	3,4 \pm 0,2

5. Diskussion:

Die Funktion inhibitorischer Synapsen ist abhängig von der Aggregation von Gephyrin und Collybistin in der postsynaptischen Membran (Kins und Betz, et al. (2000)). Die synaptische Konzentrierung der inhibitorischen Rezeptoren wird durch die Interaktion mit den zytoplasmatischen Proteinen Gephyrin und Collybistin gewährleistet. Der genaue Mechanismus des Aufbaus und der molekularen Grundlagen ist noch größtenteils unklar. In dieser Arbeit konnte mittels elektrophysiologischer Methoden der Einfluss der Assemblierung des postsynaptischen Netzwerks anhand der Veränderung der EC_{50} – Werte von GlyR/GABA_AR durch Rezeptor – Agonisten identifiziert werden. Durch heterologe Expression der Glyzin – und GABA_A – Rezeptoren mit Gephyrin und Collybistin in Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* konnte der Einfluss der Verankerungsproteine untersucht werden.

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse:

Es konnte mittels TEVC gezeigt werden, dass die intrazellulär lokalisierten Proteine Gephyrin und Collybistin II SH3- die apparente Glyzin – Affinität des heteropentameren GlyR $\alpha 1\beta$ und des homopentameren GlyR $\alpha 1$ -gbm verringern, jedoch keine apparente – Glyzin - Affinitätsveränderung beim GlyR $\alpha 1$ -wt bewirken. Nach dem Ausschalten der katalytischen DH – und der membranwechselwirkenden PH – Domäne von Collybistin II SH3- ist keine bzw. im Falle von der DH – Domäne nur eine geringe Affinitätsverschiebung zu beobachten. Interessanterweise liegt der Schiebeeffect wieder vor, wenn die DH – und PH defizienten Collybistine zusammen in die Oozyte eingebracht werden. Die SH3 – Domäne von Collybistin besitzt auf die apparente Glyzin Affinitätsverringern des GlyR $\alpha 1$ -gbm einen inhibitorischen Effekt. Dieser kann durch Neuroligin 2 jedoch nicht durch Neuroligin 4 aufgehoben werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von Gephyrin mit dem Rezeptor benötigt wird um die Affinitätsverschiebung zu gewährleisten. Wird die Eigenschaft des Gephyrins Tri- bzw. Dimere auszubilden verhindert, findet keine Affinitätsverringern mehr durch Collybistin II SH3- statt. Die Trimerisierung von Gephyrin scheint jedoch

wichtiger zu sein als die Dimerisierung. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Taurin vermittelte Stromantwort bei GlyR $\alpha 1$ -gbm nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin drastisch auf nur noch ca. 6% des ursprünglich durch Taurin vermittelten Stroms fällt. Die untersuchten GABA_AR – Kompositionen GABA_AR $\alpha 1\beta 3$ und GABA_AR $\alpha 2\beta 3$ zeigten ebenfalls eine Verringerung der apparenten GABA – Affinität nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3-, wobei GABA_AR $\alpha 2\beta 3$ durch die alleinige Ko – Expression mit Collybistin II SH3- schon eine signifikante Verringerung der apparenten GABA – Affinität aufweist. Durch das Einbringen des Gephyrin – Bindemotivs in die NR1 – Untereinheit des NMDA - Rezeptors konnte die Liganden - Affinitätsverringern, nach Ko – Expression von Gephyrin und Collybistin II SH3-, auch an einem exzitatorisch fungierenden Rezeptor beobachtet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Collybistin II SH3- fähig ist Gephyrin und GlyR $\alpha 1$ -gbm in wabenförmige Strukturen zu ordnen und die Clustergröße von GlyRs $\alpha 1$ -gbm wurde nach Ko-Expression von Gephyrin und Collybistin II SH3- erhöht. Collybistin II SH3- scheint demzufolge eine dominante Rolle bei der Translokierung von Gephyrin und GlyR $\alpha 1$ -gbm zu besitzen. Dies könnte mit der durch Collybistin II SH3- mediierten apparenten Liganden – Affinitätsverringern korrelieren.

5.2 Die Schlüsselrolle der Collybistin - Verankerung bei der Verringerung der apparenten Liganden – Affinität von postsynaptischen Rezeptoren

Es wird vermutet, dass die SH3 – Domäne von Collybistin als auto - inhibitorische – Domäne fungiert und Collybistin in einer inaktiven Konformation belässt. Harvey et al., untersuchten 2004 die SH3 – Domäne der splice Varianten von Collybistin II und Collybistin III und fanden heraus, dass im postnatalen Nager – Gehirn die inaktiven Collybistin II SH3+ und Collybistin III SH3+ Isoformen überwiegen. Außerdem wurde gezeigt, dass in transfizierten Kortexneuronen sowohl die SH3 – Domäne tragenden Collybistin Varianten als auch die nicht SH3 – Domäne tragenden Collybistin Varianten in der Lage sind Gephyrin in synaptische Anreicherungen umzuverteilen. Dies lässt

vermuten, dass in spezifischen neuronalen sub – Populationen die SH3 – Domäne tragenden Collybistin Isoformen lokal aktiviert werden können. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass NL2 und die GABA_AR $\alpha 2$ – Untereinheit mit Gephyrin und wahrscheinlich auch mit der SH3 – Domäne von Collybistin wechselwirken können, wodurch Collybistin in seine aktive Konformation überführt wird und es zu einer Collybistin - abhängigen Gephyrin - Anreicherung kommt (Poulopoulos et al., 2009; Saiepour et al., 2010). Die Ergebnisse in dieser Arbeit durch funktionelle Analyse von inhibitorischen Rezeptoren mittels TEVC zeigen ebenfalls (Kap. 4.17), dass NL2 in der Lage ist eine Collybistin – abhängige Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität zu bewirken. Somit kann in dieser Arbeit bestätigt werden, dass die auto-inhibitorische Eigenschaft der SH3 – Domäne von Collybistin II SH3+ durch die Anwesenheit von NL2 aufgehoben werden kann, auch wenn die Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität nicht so stark ausfällt wie bei der konstitutiv aktiven Collybistin II SH3- Isoform. Außerdem zeigen die Ableitungen von GABA_ARs $\alpha 2\beta 3$ (Kap. 4.9), dass Collybistin ohne Ko – Expression von Gephyrin die apparente GABA – Affinität verringert. Die Wechselwirkung von den GABA_AR – Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 3$, $\beta 2$ und $\beta 3$ mit Gephyrin konnte schon in vorangegangenen Studien nachgewiesen werden (Kowalczyk et al., 2012; Tretter et al., 2008; Tretter et al., 2011; Murkherjee et al., 2011). Aber erst die Arbeitsgruppe um Saiepour konnte 2010 zeigen, dass die GABA_AR $\alpha 2$ – Untereinheit nicht nur mit Gephyrin wechselwirken kann sondern auch in der Lage ist mit Collybistin zu interagieren. Betrachtet man die Ergebnisse von GABA_ARs $\alpha 1\beta 3$ (Kap. 4.8) lässt sich beobachten, dass für die Verringerung der apparenten GABA – Affinität eine Wechselwirkung mit Gephyrin und Collybistin vorhanden sein muss. Gephyrin alleine scheint nach Ko – Expression mit GABA_ARs $\alpha 1\beta 3$ keinen signifikanten Einfluss auf die apparente GABA – Affinität zu besitzen. Erst die Ko-Expression von GABA_ARs $\alpha 1\beta 3$ mit Gephyrin und Collybistin II SH3- führt zu einer Verringerung der apparenten GABA – Affinität. Vergleicht man die Ergebnisse von GABA_ARs $\alpha 1\beta 3$ und GABA_ARs $\alpha 2\beta 3$ könnte man vermuten das Gephyrin nur eine „Linker“ – Rolle bei GABA_ARs $\alpha 1\beta 3$ /Collybistin II SH3- erfüllt. Festzuhalten bleibt, dass erst die Expression von Collybistin II SH3-, ob ohne Gephyrin wie bei

GABA_ARs $\alpha 2\beta 3$ oder mit Gephyrin bei GABA_ARs $\alpha 1\beta 3$, zu der Verringerung der apparenten GABA - Affinität führt.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss der Gerüstproteine Gephyrin und Collybistin II SH3- auf die apparente Liganden – Affinität des exzitatorisch fungierenden Glutamat – Rezeptors mit der Untereinheitenkombination NR1 β C/NR2A untersucht. Um eine Wechselwirkung des NR1 β C/NR2A Rezeptors mit den an inhibitorischen Synapsen vorkommenden Gerüstproteinen gewährleisten zu können, wurde nahe des intrazellulären C – Terminus ein Gephyrinbindemotiv inkloniert. Die Rationale für diesen Versuch war, dass Stephenson et al. im Jahre 2000 zeigen konnte das bei NMDA Rezeptoren mit der Komposition NR1/NR2A nach Ko-Expression mit PSD - 95 der EC₅₀ – Wert für den Liganden Glutamat sich um das 5 – fache erhöhte im Vergleich zu NR1/NR2A in Abwesenheit von PSD - 95. Das Verankerungsprotein PSD – 95 nimmt eine große Rolle bei der Verankerung der NMDARs und AMPARs in die postsynaptische Membran ein. Welche Auswirkungen auf die apparente Liganden – Affinität hätte es wenn ein eigentlich exzitatorisch wirkender Rezeptor mit inhibitorischen Gerüstproteinen wechselwirkt? Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass nach Ko - Expression von NR1 β C/NR2A mit Gephyrin und Collybistin II SH3- eine signifikante Verringerung der apparenten Glyzin/Glutamat – Affinität zu beobachten ist. Ebenfalls ersichtlich hierbei ist das Gephyrin ohne Ko- Expression mit Collybistin II SH3- keine signifikante Veränderung der apparenten Glyzin/Glutamat – Affinität bewirkt. Möglicherweise erfüllt Gephyrin wie auch schon bei den GABA_ARs beobachtet wurde eine Brückenfunktion um den NR1 β C/NR2A – Rezeptor mit Collybistin zu verbinden. Dies würde bedeuten, dass die Eigenschaften der Collybistin II SH3- Domänen für den beschriebenen Effekt verantwortlich wären. Die Eigenschaften der SH3 – Domäne wurden schon weiter oben diskutiert. Welche Rolle spielen also die DH -, und PH – Domäne bei der Verringerung der apparenten Liganden – Affinität? Diese werden im nachfolgenden Kapitel besprochen. Insgesamt lässt sich festhalten das die Verringerung der apparenten Liganden – Affinität durch die Gerüstproteine Gephyrin und Collybistin II SH3- nicht spezifisch für die inhibitorischen postsynaptischen GlyRs

und GABA_ARs sind, sondern auch für Rezeptoren gilt, welche in der Natur nicht mit Gephyrin und Collybistin wechselwirken.

Ein weiterer Hinweis, dass Collybistin II SH3- eine zentrale Rolle bei der Verankerung von inhibitorischen postsynaptischen Rezeptoren besitzt, konnte mittels konfokaler Laserrastermikroskopie in Kap. 4.5 gezeigt werden. Es scheint, dass Collybistin II SH3- für eine starke Umverteilung des GlyR $\alpha 1$ -gbm-GFP in wabenförmige Strukturen verantwortlich ist nach Ko-Expression mit Gephyrin. Gephyrin konnte ebenfalls durch Ko-Expression mit Collybistin II SH3- in wabenförmige Strukturen überführt werden. Dies könnte ebenfalls dafür sprechen, dass durch die Verankerungsproteine Gephyrin und Collybistin II SH3- die Lokalisation des GlyR in der Oozytenmembran beeinflusst wird. Möglicherweise sind die wabenförmigen Strukturen aber auch auf das direkt unter der Oozytenmembran liegende ER-Netzwerk zurückzuführen (Terasaki et al., 2001).

5.3 Collybistin II SH3- begünstigt möglicherweise die Inkorporation von Rezeptoren in PI3P – reiche Membranregionen

In dem vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass Gephyrin, möglicherweise als Brückenglied, zusammen mit Collybistin II SH3- die apparente Affinität von inhibitorischen GlyRs und GABA_ARs verringert. Dies konnte ebenfalls an einem exzitatorisch wirkenden Glutamat – Rezeptor NR1 β C/NR2A beobachtet werden. Weiterhin wurde die SH3 – Domäne von Collybistin diskutiert. Inwiefern die PH – und DH - Domänen von Collybistin für die Verringerung der apparenten Liganden – Affinität verantwortlich sein kann, soll in diesem Kapitel diskutiert werden.

Kalscheuer et al. konnten 2009 zeigen, dass durch die Deletion der PH – Domäne von Collybistin die Interaktion mit PI3P aufgehoben, aber die Wechselwirkung mit Gephyrin nicht beeinflusst wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der Collybistin PH – Domäne mit PI3P durch die Aminosäurenaustausche RR363-364NN in der $\beta 3$ - $\beta 4$ Schleife verhindert wird. Die positive Ladung der $\beta 1$ - $\beta 2$ und $\beta 3$ - $\beta 4$ - Schleifen von PH – Domänen sind bekannt dafür eine wichtige Rolle bei der Verankerung in

Membranen zu besitzen (Hyvonen et al., 1995; Yu et al., 2004; DiNitto und Lambright, 2006). Die Ergebnisse in (Kap. 4.18) zeigen, dass die Verhinderung der Interaktion der Collybistin II SH3- PH – Domäne mit PI3P die Collybistin II SH3- abhängige Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität aufhebt. Dieses Ergebnis zeigt erneut, dass nicht die Wechselwirkung mit Gephyrin entscheidend für die Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität ist, sondern die Wechselwirkung der PH-Domäne von Collybistin SH3- mit PI3P. Aus welchem Grund könnte die Wechselwirkung der PH – Domäne von Collybistin II SH3- mit PI3P einen erheblichen Einfluss auf die Verringerung der apparenten Liganden – Affinität besitzen?

Es wäre denkbar, dass GlyRs und GABA_ARs durch die Wechselwirkung von Collybistin II SH3- mit PI3P in Cholesterol reiche Membranregionen überführt werden. Für das nahe verwandte PIP2 sind Interaktionen mit Cholesterol beschrieben (Taglieri et al., 2013). Ebenfalls dafür sprechen würde, dass in der Studie von Sooksawate und Kollegen von 2001 gezeigt werden konnte, dass die Anreicherung von Cholesterol mittels methyl- β -cyclodextrin in die Membran von hippocampalen Neuronen die apparente Liganden - Affinität von GABA_ARs verringert. Generell konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es eine klare Korrelation zwischen Cholesterolgehalt in der Membran und der apparenten Liganden – Affinität gibt. Fong et al. zeigten 1986, dass die Umgebung des AChR, unter anderem auch Cholesterol, die Fluidität der Membran beeinflusst und die AChRs modulieren kann. Dementsprechend könnte durch die Collybistin II SH3- medierte Umverteilung von GlyRs/GABA_ARs in Cholesterol reiche Membranbereiche die apparente Glyzin/GABA - Affinität abnehmen.

Die Interaktion von der Collybistin II SH3- PH - Domäne mit PI3P ist möglicherweise ausschlaggebend für die Verringerung der apparenten Liganden – Affinität. Wie in Kap. 4.18 zu sehen ist, besitzt möglicherweise auch die Collybistin DH – Domäne einen Einfluss auf die Verringerung der apparenten Affinität, wobei die Collybistin II SH3- Variante mit Punktmutationen in der PH – Domäne (RR363-364-NN) eine intakte DH – Domäne besitzt und sich zeigt, dass die Collybistin II SH3- medierte Verringerung der apparenten Glyzin - Affinität ausbleibt. Dies würde dafür sprechen, dass die DH –

Domäne keinen Einfluss auf die Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität besitzt. Wird jedoch die Collybistin II SH3- Variante mit Punktmutationen in der DH – Domäne (NE261-262AA) betrachtet ist zu beobachten, dass die Collybistin II SH3- medierte Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität höchstsignifikant schwächer ausfällt, jedoch noch ein Schiebefekt im Vergleich zu $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin zu erkennen ist. Die DH – Domänen sind bekannt für die Aktivierung des GDP/GTP – Austauschs bei Onkoproteinen (Hart et al., 1994). Bislang ist nur die GTPase Cdc42 bekannt dafür durch Collybistin aktiviert zu werden (Reid et al., Xiang et al., 2006). Es wurde vermutet, dass die Interaktion von Collybistin mit Cdc42 und die Aktivierung von Cdc42 für die Gephyrin – Anreicherung an der inhibitorischen Postsynapse notwendig ist (Kneussel und Betz, 2000). Die Analyse von der Collybistin Variante mit Punktmutationen in der DH-Domäne (NE261-262AA) und knockout von Cdc42 in der Maus zeigen, dass Cdc42 nicht essentiell für die Formierung von inhibitorischen Synapsen ist (Reddy-Alla et al. 2010). Möglicherweise werden andere, bis jetzt noch nicht identifizierte, Rho-GTPasen durch Collybistin aktiviert. Die höchstsignifikante Abschwächung der Collybistin II SH3- medierte Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität durch die Collybistin II SH3- DH – Domäne (NE261-262AA) Variante könnte auch dadurch hervorgerufen werden, dass die Collybistin II SH3- Proteinstruktur so verändert wird, dass die Wechselwirkung der PH – Domäne mit PI3P geschwächt wird. Interessanterweise ist nach der Ko – Expression von Collybistin II SH3- (NE261-262AA) und Collybistin II SH3- (RR363-364NN) mit GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin im Vergleich zu GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin/Collybistin II SH3- kein signifikanter Unterschied in der Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität zu beobachten. Eine mögliche Erklärung wäre hierfür das Collybistin II SH3- intrazellulär nicht als Monomer sondern als Dimer vorliegt. Es ist bekannt, dass das Cool-2/ α -Pix Protein, welches wie Collybistin eine Guanin – Nukleotid – Austauschfaktor Funktion erfüllt, als Dimer vorliegt und eine hohe Homologie zu Collybistin in Ihrer Domänenstruktur aufweist (Baird et al., 2005).

Im nächsten Kapitel soll der Frage nachgegangen werden inwiefern Gephyrin die Verringerung der apparenten Liganden – Affinität beeinflusst. Die bisher diskutierten Ergebnisse sprechen dafür, dass Gephyrin eine Brückenfunktion übernimmt und die

Rezeptoren mit Collybistin verlinkt, sodass die Rezeptoren indirekt durch Gephyrin über die Collybistin PH – Domäne – Interaktion mit PI3P in PI3P – reiche Membranbereiche überführt werden können.

5.4 Einfluss der Interaktions – Möglichkeiten von GlyRs und Gephyrin auf die apparente Glyzin-Affinität

In den vorangegangenen Kapiteln wurde der Einfluss von Collybistin auf die Verringerung der apparenten Liganden – Affinität diskutiert. In diesem Kapitel soll der mögliche Einfluss von Gephyrin auf die Verringerung der apparenten Liganden – Affinität diskutiert werden. In Kap. 4.2 wird ersichtlich dass die GlyRs $\alpha 1$ -wt, welche nicht mit Gephyrin wechselwirken können, keine Veränderung in der apparenten Glyzin – Affinität nach Ko – Expression mit Gephyrin und Collybistin II SH3- aufweisen. Dies bedeutet, dass die Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität abhängig von einer Gephyrin – Interaktion ist, da für GlyRs nicht bekannt ist, dass sie direkt mit Collybistin interagieren können. Gleiches lässt sich aus Kap. 4.20 schließen, in welcher die GlyR bindedefiziente Gephyrin Mutante (E_{mut}) nach Ko – Expression mit Collybistin II SH3- und GlyR $\alpha 1$ -gbm nicht zu einer Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität führt. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin (Kap. 4.2) im Vergleich zu GlyR $\alpha 1$ -gbm eine signifikante Verringerung der apparenten Glyzin- Affinität hervorruft. Jedoch bei GlyR $(\alpha 1\beta)_7$ /Gephyrin im Vergleich zu GlyR $(\alpha 1\beta)_7$ keine Signifikanz festzustellen ist. Wie lässt sich dieser Effekt erklären? GlyR $\alpha 1$ -gbm besitzt, im Gegensatz zu den drei Gephyrin - Bindemöglichkeiten des heteropentameren GlyR $(\alpha 1\beta)_7$ durch die β – Untereinheit (Grundzinska et al., 2005), fünf Interaktionsmöglichkeiten mit Gephyrin da jede Untereinheit ein Gephyrin – Bindemotiv beherbergt. Maric et al. zeigten 2011, dass die Affinität einer β - Untereinheit für das Gephyrin E – Dimer 25-fach geringer ist als die eines β – Untereinheiten – Dimers. Daraus könnte abgeleitet werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Gephyrin – GlyR Interaktion im Falle von GlyR $\alpha 1$ -gbm im Vergleich zu GlyR $(\alpha 1\beta)_7$ ansteigt. Dagegen würde allerdings sprechen, dass Gephyrin E – Dimere nach Berechnungen der Arbeitsgruppe Heine et al. im Jahre 2014 eine Größe

von ca 5 x 11nm besitzen. Wäre die hexagonale Gephyrin - Matrix planar, würde sich auch ein Abstand der Gephyrin E – Dimere zueinander im Nanometerbereich ergeben. Der GlyR – Komplex hingegen, bestehend aus 5 Untereinheiten, besitzt einen Durchmesser von ca. 80 Å (Lynch., 2004). Die Verankerung eines GlyR über die intrazelluläre Schleife (TM3-TM4) scheint aus diesem Grund nur mit einem Gephyrin E – Dimer möglich und dadurch auf zwei Bindungen limitiert zu sein. Da jedoch bislang kein 3D – Modell der hexagonalen Gephyrin – Matrix existiert kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Interaktionen des GlyR mit benachbarten Gephyrin E – Dimeren zustande kommen. Die planare Variante der hexagonalen Gephyrin Matrix wird jedoch präferiert (Specht et al., 2013). Die Ergebnisse von GlyR $\alpha 1$ -gbm/Gephyrin im Vergleich zu GlyR ($\alpha 1\beta$)_T/Gephyrin würden jedoch dafür sprechen, dass die Anzahl der Interaktionsmöglichkeiten des GlyR mit Gephyrin bei der Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität eine Rolle spielt. Möglicherweise ist die Gephyrin – medierte Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität bei GlyR ($\alpha 1\beta$)_T durch die weniger starke Wechselwirkung mit Gephyrin im Vergleich zu GlyR $\alpha 1$ -gbm nicht signifikant. Ein weiterer Faktor könnte ebenfalls an der Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität beteiligt sein. Legendre et al. zeigten 2001, dass die Desensitisierung von homopentameren GlyRs $\alpha 1$ -gbm durch die Anwesenheit von Gephyrin schneller abläuft. Die Desensitisierung könnte, wie auch die Liganden-Affinität und Modifikationen der Kanal - Effizienz (Colquhoun et al., 1998) einen Einfluss auf den EC₅₀ – Wert besitzen. Da in den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen nur die „whole – cell“ Konfiguration zum Einsatz kam, können die einzelnen Determinanten nicht voneinander separiert werden. Aus diesem Grund kann auch nur von der apparenten Liganden – Affinität gesprochen werden.

Es konnte in dieser Arbeit also auch gezeigt werden, dass eine Gephyrin – medierte Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität bei GlyR $\alpha 1$ -gbm nach Ko – Expression mit Gephyrin aber ohne Collybistin SH3- zu beobachten ist. Es stellt sich noch die Frage ob die Gephyrin G-Domäne und die Gephyrin E-Domäne durch die Tri-, und Dimerisierungseigenschaften ebenfalls einen Einfluss auf die Collybistin II SH3- medierte Verringerung der apparente Glyzin Affinität besitzen?

Nach Ausschalten der Trimerisierungseigenschaft (G-Domäne – G_{4XR}) und Dimerisierungseigenschaft (E-Domäne – E_{RER}) von Gephyrin (Kap. 4.21) konnte nicht mehr die Collybistin II SH3- medierte Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität beobachtet werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Trimerisierungseigenschaft von Gephyrin essentieller für den Effekt ist als die Dimerisierungseigenschaft. Allerdings wäre bei der Dimerisierungsdefizienten Gephyrin – Mutante erwartet worden dass keine Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität nach Ko – Expression von Collybistin II SH3- zu beobachten ist, da in dem Dimerisierungsinterface der E-Domänen die Bindestelle für die β – Untereinheit des GlyR vermutet wird (Sola et al., 2004). Es konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass die Wechselwirkung von GlyRs mit Gephyrin gewährleistet sein muss um die Collybistin II SH3 – medierte Verschiebung der apparenten Glyzin – Affinität zu höheren Glyzinkonzentrationen zu ermöglichen. Außerdem konnte auch eine Gephyrin medierte Verringerung der apparenten Glyzin – Affinität bei GlyRs $\alpha 1$ -gbm nachgewiesen werden.

5.5 Gephyrin und Collybistin II SH3- bewirken bei GABA_ARs nach Ko-Expression mit der $\gamma 2s$ – Untereinheit keine Verringerung der apparenten GABA – Affinität

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Frage welchen Einfluss die GABA_AR $\gamma 2s$ – Untereinheit auf die apparente GABA – Affinität besitzt. Nach Ko – Expression von GABA_AR $\alpha 2\beta 3$ mit der $\gamma 2s$ – Untereinheit verringerte sich die apparente GABA – Affinität im Vergleich zur alleinigen Expression von GABA_AR $\alpha 2\beta 3$ drastisch um ca. das 7 – fache (siehe Kap. 4.10). Es ist bekannt, dass GABA_ARs mit der Komposition aus zwei $\alpha 1$, $\alpha 2$ oder $\alpha 3$ zusammen mit zwei $\beta 2$ oder $\beta 3$ und einer $\gamma 2$ – Untereinheit synaptisch lokalisiert sind. Außerdem sind GABA_ARs mit dieser Zusammenstellung optimiert auf hohe GABA – Konzentration im synaptischen Spalt. Die GABA_ARs $2\alpha:2\beta:1\gamma 2$ besitzen dementsprechend keine hohe Affinität für GABA (Perrais and Ropert, 1999) im Vergleich zu hochaffinen extrasynaptisch lokalisierten GABA_ARs welche meist eine δ – Untereinheit besitzen (Brown et al., 2002). Nach Ko – Expression von Gephyrin

und/oder Collybistin II SH3- mit GABA_AR $\alpha 1\beta 3\gamma 2s$ und GABA_AR $\alpha 2\beta 3\gamma 2s$ konnte keine weitere Verringerung der apparenten GABA – Affinität beobachtet werden. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die Verringerung der apparenten GABA – Affinität durch die $\gamma 2s$ – Untereinheit die durch die Verankerungsproteine resultierende Verringerung der apparenten GABA – Affinität überlagert. Gephyrin und Collybistin II SH3- bewirken nur eine Verringerung der apparenten GABA – Affinität um das 2-fache (siehe Kap. 4.8). Der Effekt die apparente GABA – Affinität der GABA_ARs zu verringern ist durch die Inkorporation der $\gamma 2s$ – um das ca. 4 – fache stärker als die Wechselwirkung der GABA_ARs mit den Verankerungsproteinen Gephyrin und Collybistin II SH3- hervorrufen kann.

5.6 Vergleich der Wechselwirkungsstärken von GABA_AR α -, β – Untereinheiten mit Gephyrin und von der GlyR β – Untereinheit mit Gephyrin und deren Einfluss auf die apparente Liganden - Affinität

Interessanterweise ist die Wechselwirkung von Gephyrin mit GABA_AR β – Untereinheiten um das 20 – fache schwächer als die Wechselwirkung mit der β – Untereinheit des GlyR (Kowalczyk et al., 2013). Die Wechselwirkungsstärke der GABA_AR α – Untereinheit mit Gephyrin ist sogar um das 35 – bis 120 – fache geringer (Maric et al., 2011). Möglicherweise ist aus diesem Grund die Verringerung um das 8- bis 10- fache der apparenten Glyzin - Affinität von GlyRs $\alpha 1$ -gbm nach Ko – Expression von Gephyrin und Collybistin II SH3- (siehe. Kap. 4.2) stärker als die Verringerung um das 2 – fache der apparenten GABA – Affinität bei GABA_ARs ko – exprimiert mit Gephyrin und Collybistin II SH3-. Denkbar wäre eine direkte Korrelation der Bindungsstärke des Gephyrin mit GABA_AR α, β -/GlyR β - Untereinheiten und der Verringerung der apparenten Liganden – Affinität.

5.7 Auswirkungen von Gephyrin und Collybistin II SH3- auf die Taurin vermittelte Stromantwort des GlyR

Die freie Aminosäure Taurin ist besonders stark bei Säugetieren im zentralen Nervensystem (ZNS) vorzufinden und spielt bei physiologischen Vorgängen eine große Rolle. Beispielsweise ist Taurin in Prozesse der Anti – Nozizeption im Rückenmarksbereich involviert und tritt dort als Modulator auf (Wu et al., 2008). Weiterhin besitzt Taurin eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems und ist ebenfalls an der Aufrechterhaltung der zellulären Osmolarität beteiligt (Hussy et al., 1997, 2001; Schaffer et al., 2000). Taurin ist außerdem in der Lage inhibitorische Effekte an Neuronen zu modulieren (Beluzzi et al., 2004; Xu et al., 2004). Taurin besitzt die Fähigkeit GABA_ARs und GlyRs in verschiedenen Gehirnregionen zu aktivieren (Horikoshi et al., 1988; Hussy et al., 1997; Wu et al., 2008). Die Aktivierung der inhibitorischen Rezeptoren ist jedoch konzentrationsabhängig. Beispielsweise werden GlyRs in substantia gelatinosa Neuronen mit 0,3mM Taurin aktiviert, wohingegen Taurin bei GABA_ARs nur als schwacher Agonist (3mM) agiert (Wu et al., 2008). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass in hippocampalen Neuronen Taurin extrasynaptische GlyRs aktiviert (Mori et al., 2002). Bislang wurde jedoch noch nicht untersucht wie sich eine Interaktion der GlyRs mit Gephyrin und Collybistin II SH3- auf die Taurin vermittelte Rezeptorantwort auswirkt. Wie in Kap. 4.13 zu sehen, führt die Wechselwirkung des GlyR mit den Verankerungsproteinen Gephyrin und Collybistin II SH3- zu einer stark verminderten Taurin medierten Stromantwort im Vergleich zu GlyRs welche nicht mit den beiden Proteinen interagieren. Nicht verankerte GlyRs zeigen jeweils nach Aktivierung durch Taurin oder Glyzin in etwa den gleichen Rezeptorstrom, wobei Taurin in diesem Fall als voller Agonist agiert. Dies könnte bedeuten, dass extrasynaptische nicht verankerte GlyRs auf Taurin reagieren im Gegensatz zu synaptisch lokalisierten, verankerten GlyRs. Möglicherweise konkurrieren im synaptischen Spalt Taurin, durch Diffusion aus dem extrazellulären Raum, und Glyzin um die freien Bindestellen des GlyR. In diesem Fall wäre Taurin aber kein Agonist sondern hätte in diesem speziellen Fall eine antagonistische Funktion und würde eine Hyperpolarisierung der nachgeschalteten Neuronenmembran erschweren.

Als Resultat davon würde die phasische Inhibition reduziert werden. Es ist weiterhin vorstellbar dass durch diesen Mechanismus die phasische Aktivierung von synaptischen GlyRs durch diffundierendes Taurin ausgeschaltet wird.

5.8 Mögliche physiologische Relevanz von niederaffinen synaptischen Rezeptoren und hochaffinen extrasynaptischen Rezeptoren am Beispiel des GlyRs

Schlussfolgernd könnte man mutmaßen, wenn man die Ergebnisse der Ableitungen von der Oozytenmembran auf das Neuron transferiert, dass die synaptischen, durch Gephyrin und Collybistin II SH3- verankerten heteropentameren GlyRs, niederaffin für Glyzin zu sein scheinen. Die extrasynaptisch lokalisierten homopentameren GlyRs hingegen eine höhere Affinität für Glyzin aufweisen. Welchen physiologischen Nutzen könnte diese Unterteilung der Rezeptorpopulationen mit sich bringen? Dies könnte sich dadurch erklären, dass bei überschüssiger Transmitterfreisetzung der Präsynapse geringe Transmitter Konzentrationen in extrazelluläre Regionen des synaptischen Spaltes gelangen können. Außerdem wird ebenfalls eine nicht synaptische Glyzinfreisetzung von Gliazellen vermutet (Dopico et al., 2006; Roux et al., 2000). Um diese geringen Konzentrationen im Extrazellulärraum effektiv für eine Inhibition nutzen zu können würden hochaffine GlyRs sinnvoll erscheinen. Dadurch könnte eine tonische Inhibition als Resultat von aktivierten hochaffinen homomeren GlyRs durch dauerhaft niedrige Glyzinkonzentrationen im extrazellulären Raum auftreten. Synaptisch lokalisierte heteropentamere GlyRs wären hingegen für die phasische Inhibition zuständig und könnten aufgrund der überschüssigen Glyzin – Transmitterfreisetzung der Präsynapse auch mit einer geringeren Affinität für Glyzin auskommen.

5.9 Ausblick

Der in dieser Arbeit vorgestellte Versuchsaufbau um apparente Liganden - Affinitätsveränderungen bei ionotropen Membranrezeptoren durch deren

Wechselwirkungen mit intrazellulären Proteinen zu bestimmen, könnte ebenfalls dafür angewendet werden um Krankheits - assoziierte Mutationen von Gephyrin und Collybistin zu untersuchen. Beispielsweise wurde eine Missense Mutation an der Position R338W im Collybistin entdeckt, welche zur mentalen Retardierung führt. Durch diese Mutation ist Collybistin nicht mehr in der Lage mittels der PH-Domäne an PI3P zu binden (Long et al., 2015). Ebenfalls wurde eine weitere Punktmutation in der DH – Domäne bei einem Patienten mit mentaler Retardierung und Epilepsie gefunden, welche zu einer Schwächung der DH – PH – Domänen Interaktion und somit zu einer Schwächung der Bindungsstärke zwischen der PH – Domäne und PI3P führt (Papadopoulos et al., 2015). Es ist auch ein Patient bekannt, welcher an der Position des Gephyrins G375D eine Punktmutation aufweist und diese Mutation sich in einer Form von Epilepsie äußert (Dejanovic et al., 2015). Eine funktionelle Charakterisierung durch den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau, könnte helfen diese Erkrankungen besser zu verstehen

Literaturverzeichnis

- Arias, H. R. (2000). "Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors." Neurochem Int **36**(7): 595-645.
- Baird, D., Q. Feng, et al. (2005). "The Cool-2/ α -Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade." Curr Biol **15**(1): 1-10.
- Bausen, M., J. C. Fuhrmann, et al. (2006). "The state of the actin cytoskeleton determines its association with gephyrin: role of ena/VASP family members." Mol Cell Neurosci **31**(2): 376-386.
- Becker, C. M., I. Hermans-Borgmeyer, et al. (1986). "The glycine receptor deficiency of the mutant mouse spastic: evidence for normal glycine receptor structure and localization." J Neurosci **6**(5): 1358-1364.
- Bettler, B. and J. Y. Tiao (2006). "Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors." Pharmacol Ther **110**(3): 533-543.
- Betz, H. (1990). "Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily." Neuron **5**(4): 383-392.
- Betz, H., J. Kuhse, et al. (1999). "Structure and functions of inhibitory and excitatory glycine receptors." Ann N Y Acad Sci **868**: 667-676.
- Bormann, J., N. Rundstrom, et al. (1994). "Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers." EMBO J **13**(6): 1493.
- Brejck, K., W. J. van Dijk, et al. (2001). "Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors." Nature **411**(6835): 269-276.
- Brown, N., J. Kerby, et al. (2002). "Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human α (4) β (3) δ GABA(A) receptors." Br J Pharmacol **136**(7): 965-974.

Chen, X., T. I. Webb, et al. (2009). "The M4 transmembrane segment contributes to agonist efficacy differences between alpha1 and alpha3 glycine receptors." Mol Membr Biol **26**(5): 321-332.

Chubykin, A. A., D. Atasoy, et al. (2007). "Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2." Neuron **54**(6): 919-931.

Colquhoun, D. (1998). "Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors." Br J Pharmacol **125**(5): 924-947.

Conroy, W. G., Z. Liu, et al. (2003). "PDZ-containing proteins provide a functional postsynaptic scaffold for nicotinic receptors in neurons." Neuron **38**(5): 759-771.

Corringer, P. J., N. Le Novere, et al. (2000). "Nicotinic receptors at the amino acid level." Annu Rev Pharmacol Toxicol **40**: 431-458.

Dan, B. and S. G. Boyd (2003). "Angelman syndrome reviewed from a neurophysiological perspective. The UBE3A-GABRB3 hypothesis." Neuropediatrics **34**(4): 169-176.

De Saint Jan, D., B. David-Watine, et al. (2001). "Activation of human alpha1 and alpha2 homomeric glycine receptors by taurine and GABA." J Physiol **535**(Pt 3): 741-755.

Dejanovic, B., T. Djemie, et al. (2015). "Simultaneous impairment of neuronal and metabolic function of mutated gephyrin in a patient with epileptic encephalopathy." EMBO Mol Med **7**(12): 1580-1594.

DiNitto, J. P. and D. G. Lambright (2006). "Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains." Biochim Biophys Acta **1761**(8): 850-867.

Dumoulin, A., A. Triller, et al. (2009). "Cellular transport and membrane dynamics of the glycine receptor." Front Mol Neurosci **2**: 28.

Essrich, C., M. Lorez, et al. (1998). "Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin." Nat Neurosci **1**(7): 563-571.

Farrar, S. J., P. J. Whiting, et al. (1999). "Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer." J Biol Chem **274**(15): 10100-10104.

Feng, G., H. Tintrup, et al. (1998). "Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity." Science **282**(5392): 1321-1324.

Fong, T. M. and M. G. McNamee (1986). "Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes." Biochemistry **25**(4): 830-840.

Fujita, M., K. Sato, et al. (1991). "Regional distribution of the cells expressing glycine receptor beta subunit mRNA in the rat brain." Brain Res **560**(1-2): 23-37.

Graham, D., F. Pfeiffer, et al. (1985). "Purification and characterization of the glycine receptor of pig spinal cord." Biochemistry **24**(4): 990-994.

Grenningloh, G., I. Pribilla, et al. (1990). "Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor." Neuron **4**(6): 963-970.

Griffon, N., C. Buttner, et al. (1999). "Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly." EMBO J **18**(17): 4711-4721.

Grosskreutz, Y., A. Hermann, et al. (2001). "Identification of a gephyrin-binding motif in the GDP/GTP exchange factor collybistin." Biol Chem **382**(10): 1455-1462.

Grudzinska, J., R. Schemm, et al. (2005). "The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors." Neuron **45**(5): 727-739.

Hart, M. J., A. Eva, et al. (1994). "Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product." J Biol Chem **269**(1): 62-65.

Heine, M., A. Karpova, et al. (2013). "Counting gephyrins, one at a time: a nanoscale view on the inhibitory postsynapse." Neuron **79**(2): 213-216.

Hirose, S., R. P. Mohn, et al. (2003). "The genetics of febrile seizures and related epilepsy syndromes." Brain Dev **25**(5): 304-312.

Hoon, M., T. Soykan, et al. (2011). "Neurologin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(7): 3053-3058.

Horikoshi, T., A. Asanuma, et al. (1988). "Taurine and beta-alanine act on both GABA and glycine receptors in *Xenopus* oocyte injected with mouse brain messenger RNA." Brain Res **464**(2): 97-105.

Hussy, N., C. Deleuze, et al. (1997). "Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation." J Physiol **502** (Pt 3): 609-621.

Hyvonen, M., M. J. Macias, et al. (1995). "Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain." EMBO J **14**(19): 4676-4685.

Kalscheuer, V. M., L. Musante, et al. (2009). "A balanced chromosomal translocation disrupting *ARHGEF9* is associated with epilepsy, anxiety, aggression, and mental retardation." Hum Mutat **30**(1): 61-68.

Kins, S., H. Betz, et al. (2000). "Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin." Nat Neurosci **3**(1): 22-29.

Kirsch, J. and H. Betz (1993). "Widespread expression of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein, in rat brain." Brain Res **621**(2): 301-310.

Kneussel, M. and H. Betz (2000). "Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model." Trends Neurosci **23**(9): 429-435.

Kneussel, M., J. H. Brandstatter, et al. (1999). "Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice." J Neurosci **19**(21): 9289-9297.

Kofuji, P., J. B. Wang, et al. (1991). "Generation of two forms of the gamma-aminobutyric acidA receptor gamma 2-subunit in mice by alternative splicing." J Neurochem **56**(2): 713-715.

Korber, C., A. Richter, et al. (2012). "Effects of distinct collybistin isoforms on the formation of GABAergic synapses in hippocampal neurons." Mol Cell Neurosci **50**(3-4): 250-259.

Kowalczyk, S., A. Winkelmann, et al. (2013). "Direct binding of GABAA receptor beta2 and beta3 subunits to gephyrin." Eur J Neurosci **37**(4): 544-554.

Langosch, D., L. Thomas, et al. (1988). "Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7394-7398.

Legendre, P. (2001). "The glycinergic inhibitory synapse." Cell Mol Life Sci **58**(5-6): 760-793.

Legendre, P., E. Muller, et al. (2002). "Desensitization of homomeric alpha1 glycine receptor increases with receptor density." Mol Pharmacol **62**(4): 817-827.

Long, P., M. M. May, et al. (2015). "Missense Mutation R338W in ARHGEF9 in a Family with X-linked Intellectual Disability with Variable Macrocephaly and Macro-Orchidism." Front Mol Neurosci **8**: 83.

Luscher, B., T. Fuchs, et al. (2011). "GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses." Neuron **70**(3): 385-409.

Lynch, J. W. (2004). "Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel." Physiol Rev **84**(4): 1051-1095.

Lynch, J. W., S. Rajendra, et al. (1997). "Identification of intracellular and extracellular domains mediating signal transduction in the inhibitory glycine receptor chloride channel." EMBO J **16**(1): 110-120.

Maas, C., D. Belgardt, et al. (2009). "Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(21): 8731-8736.

Malizia, A. L. (2002). "Receptor binding and drug modulation in anxiety." Eur Neuropsychopharmacol **12**(6): 567-574.

Malosio, M. L., B. Marqueze-Pouey, et al. (1991). "Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain." EMBO J **10**(9): 2401-2409.

Maric, H. M., J. Mukherjee, et al. (2011). "Gephyrin-mediated gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptor clustering relies on a common binding site." J Biol Chem **286**(49): 42105-42114.

Matzenbach, B., Y. Maulet, et al. (1994). "Structural analysis of mouse glycine receptor alpha subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant." J Biol Chem **269**(4): 2607-2612.

Meyer, G., J. Kirsch, et al. (1995). "Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit." Neuron **15**(3): 563-572.

Mori, M., B. H. Gahwiler, et al. (2002). "Beta-alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro." J Physiol **539**(Pt 1): 191-200.

Mukherjee, J., K. Kretschmannova, et al. (2011). "The residence time of GABA(A)Rs at inhibitory synapses is determined by direct binding of the receptor alpha1 subunit to gephyrin." J Neurosci **31**(41): 14677-14687.

Ortells, M. O. and G. G. Lunt (1995). "Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors." Trends Neurosci **18**(3): 121-127.

Papadopoulos, T., R. Schemm, et al. (2015). "Lipid binding defects and perturbed synaptogenic activity of a Collybistin R290H mutant that causes epilepsy and intellectual disability." J Biol Chem **290**(13): 8256-8270.

Papadopoulos, T. and T. Soykan (2011). "The role of collybistin in gephyrin clustering at inhibitory synapses: facts and open questions." Front Cell Neurosci **5**: 11.

Perrais, D. and N. Ropert (1999). "Effect of zolpidem on miniature IPSCs and occupancy of postsynaptic GABAA receptors in central synapses." J Neurosci **19**(2): 578-588.

Pfeiffer, F., D. Graham, et al. (1982). "Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord." J Biol Chem **257**(16): 9389-9393.

Poulopoulos, A., G. Aramuni, et al. (2009). "Neurologin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin." Neuron **63**(5): 628-642.

Reddy-Alla, S., B. Schmitt, et al. (2010). "PH-domain-driven targeting of collybistin but not Cdc42 activation is required for synaptic gephyrin clustering." Eur J Neurosci **31**(7): 1173-1184.

Reid, T., A. Bathoorn, et al. (1999). "Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42." J Biol Chem **274**(47): 33587-33593.

Reid, T., M. R. Bathoorn A Fau - Ahmadian, et al. "Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42." (0021-9258 (Print)).

Roux, M. J. and S. Supplisson (2000). "Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries." Neuron **25**(2): 373-383.

Saiepour, L., C. Fuchs, et al. (2010). "Complex role of collybistin and gephyrin in GABAA receptor clustering." J Biol Chem **285**(38): 29623-29631.

Scheffer, I. E. and S. F. Berkovic (2003). "The genetics of human epilepsy." Trends Pharmacol Sci **24**(8): 428-433.

Schwarz, G. (2005). "Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency." Cell Mol Life Sci **62**(23): 2792-2810.

Sieghart, W. (2006). "Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes." Adv Pharmacol **54**: 231-263.

Sieghart, W., K. Fuchs, et al. (1999). "Structure and subunit composition of GABA(A) receptors." Neurochem Int **34**(5): 379-385.

Sieghart, W. and G. Sperk (2002). "Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes." Curr Top Med Chem **2**(8): 795-816.

Singer, J. H., E. M. Talley, et al. (1998). "Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons." J Neurophysiol **80**(5): 2608-2620.

Sola, M., V. N. Bavro, et al. (2004). "Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin." EMBO J **23**(13): 2510-2519.

Sola, M., M. Kneussel, et al. (2001). "X-ray crystal structure of the trimeric N-terminal domain of gephyrin." J Biol Chem **276**(27): 25294-25301.

Sooksawate, T. and M. A. Simmonds (2001). "Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of the GABA(A) receptor to GABA in acutely dissociated rat hippocampal neurones." Neuropharmacology **40**(2): 178-184.

Specht, C. G., I. Izeddin, et al. (2013). "Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites." Neuron **79**(2): 308-321.

Stallmeyer, B., G. Schwarz, et al. (1999). "The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1333-1338.

Taglieri, D. M., D. A. Delfin, et al. (2012). "Cholesterol regulation of PIP(2): why cell type is so important." Front Physiol **3**: 492.

Takahashi, T., A. Momiyama, et al. (1992). "Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels." Neuron **9**(6): 1155-1161.

Taleb, O. and H. Betz (1994). "Expression of the human glycine receptor alpha 1 subunit in *Xenopus* oocytes: apparent affinities of agonists increase at high receptor density." EMBO J **13**(6): 1318-1324.

Terasaki, M., L. L. Runft, et al. (2001). "Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation." Mol Biol Cell **12**(4): 1103-1116.

Tretter, V., T. C. Jacob, et al. (2008). "The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin." J Neurosci **28**(6): 1356-1365.

Tretter, V., B. Kerschner, et al. (2011). "Molecular basis of the gamma-aminobutyric acid A receptor alpha3 subunit interaction with the clustering protein gephyrin." J Biol Chem **286**(43): 37702-37711.

Unwin, N. (1993). "Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution." J Mol Biol **229**(4): 1101-1124.

Varoqueaux, F., G. Aramuni, et al. (2006). "Neuroligins determine synapse maturation and function." Neuron **51**(6): 741-754.

Vithlani, M., M. Terunuma, et al. (2011). "The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses." Physiol Rev **91**(3): 1009-1022.

Wassef, A., J. Baker, et al. (2003). "GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies." J Clin Psychopharmacol **23**(6): 601-640.

Whiting, P., R. M. McKernan, et al. (1990). "Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of gamma 2 phosphorylation site." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9966-9970.

Wu, J., T. Kohno, et al. (2008). "Taurine activates glycine and gamma-aminobutyric acid A receptors in rat substantia gelatinosa neurons." Neuroreport **19**(3): 333-337.

Xiang, S., E. Y. Kim, et al. (2006). "The crystal structure of Cdc42 in complex with collybistin II, a gephyrin-interacting guanine nucleotide exchange factor." J Mol Biol **359**(1): 35-46.

Xiang, S., J. Nichols, et al. (2001). "The crystal structure of Escherichia coli MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin." Structure **9**(4): 299-310.

Yu, J. W., J. M. Mendrola, et al. (2004). "Genome-wide analysis of membrane targeting by S. cerevisiae pleckstrin homology domains." Mol Cell **13**(5): 677-688.

Zeilhofer, H. U., H. Wildner, et al. (2012). "Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control." Physiol Rev **92**(1): 193-235.

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

Personal Data

- Jan Baltzer
- Date of Birth: 07.07.1981
- Birth Place: Frankfurt a.M
- Mobil: +49 (0)151/70822529
- E-Mail: jan.baltzer81@gmx.de



PhD - Thesis

2011-2018 Technische Universität Darmstadt, Faculty Biology

PhD – Thesis Biology

- Topic: Effects on Pharmacology and Translocation through the intracellular anchoring Proteins Gephyrin and Collybistin at Glycine- and GABA_A Receptors

Education

2003-2010 Technische Universität Darmstadt, Faculty Biology

Diploma Biologist

- Topic: Effects on Pharmacology and Translocation through the intracellular anchoring Proteins Gephyrin and Collybistin at the human Glycine Receptor (very good)
 - Key aspects: Developmental biology, plant physiology, animal physiology

2002-2003 Fachhochschule Gießen-Friedberg, Gießen

- Biotechnology

1992-2001 Ricarda-Huch-Schule – secondary school, Dreieich-Sprendlingen

- Degree: General qualification for university entrance

1988-1992 Karl-Nahrgang-Schule – elementary school, Dreieich-Götzenhain